

**Herstellung rekombinanter  
„single chain“ Antikörper (scFv)  
gegen Sulfonamide**

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades einer

**Doktorin der Naturwissenschaften**

**- Dr. rer. nat. -**

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Ilka Ottleben

geboren am 30.07.1976, in Hannover

**2006**

Referent : Prof. Dr. H.-J. Jacobsen  
Korreferent : HD. Dr. B. Huchzermeyer  
Tag der Promotion : 18.04.2006

Für meine Eltern

## Zusammenfassung

Sulfonamide sind eine Gruppe antibiotisch wirksamer Verbindungen, deren Wirkung auf einer kompetitiven Inhibition der Dihydropterinsäure-Synthetase, des ersten entscheidenden Enzyms innerhalb des bakteriellen Folsäure-Metabolismus beruht. Aus immunologischer Sicht stellen sie Haptene dar. Sulfonamide werden sowohl in der Humanmedizin zur Behandlung bakterieller Infektionen verwendet als auch in der Veterinärmedizin zu therapeutischen und prophylaktischen Zwecken sowie als Wachstumsförderer eingesetzt. Als Konsequenz sind Sulfonamid-Rückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft nachweisbar und stellen ein Gesundheitsrisiko für den Verbraucher dar. Der Nachweis von Sulfonamid-Rückständen in Lebensmitteln erfolgt bislang mit konventionellen analytischen Detektionsmethoden. Ein Sulfonamid-spezifischer Antikörper wäre für die Entwicklung eines einfachen, spezifischen und für die parallelisierte Anwendung geeigneten Assays wünschenswert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich ein Sulfamethoxypyridazin-spezifischer „single chain“ Antikörper (scFv) über die Methode des „Phage Displays“ generiert werden. Dieser Antikörper weist eine hohe Affinität zu Sulfamethoxypyridazin (SMP) auf ( $K_D$   $7,74 \times 10^{-8}$  M) und seine Bindung erfolgt kompetitiv. Für die Selektion dieses Antikörpers wurde eine humane semisynthetische „single framework“ Bibliothek (ETH-2) eingesetzt. Die Immobilisierung der Sulfonamide erfolgte über im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte und erprobte flexible Linker-Moleküle. Damit konnte eine alternative Route zur sonst üblichen Derivatisierung der Haptene mit Trägerproteinen etabliert werden. Idealerweise wird dieser Antikörper in einem hocheffizienten Expressionssystem produziert. Dazu ist ein pflanzliches System besonders geeignet. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen dieser Arbeit ein auf transgenen Pflanzen (*Nicotiana tabacum*) basierendes Modellsystem für die heterologe Expression rekombinanter „single chain“ Antikörper entwickelt. Die Transformation eines Modell-scFv-Konstruktes in *N. tabacum* konnte erfolgreich durchgeführt werden und das rekombinante Protein wurde aus T<sub>1</sub>-Pflanzen isoliert und immunbiochemisch nachgewiesen.

Schlagwörter: scFv, „Phage Display“, Sulfonamide

## Abstract

Sulfonamides are compounds with antibiotic effect. Their activity depends on the competitive inhibition of the dihydropteroate synthase, the first crucial enzyme in bacterial folate metabolism. Immunologically they can be described as haptens due to their simple structure and low molecular weight. Sulfonamides are widely used for the treatment of bacterial infections in human health care as well as in veterinary medicine for therapeutic and prophylactic purposes and as growth promoters. As a consequence sulfonamide residues are detectable as contaminants in food derived from animal tissues. This implies a risk for the consumer's health. For the development of a simple and specific detection assay, which is also suitable for parallel applications, a sulfonamide-specific antibody would be desirable.

During the work as detailed below a sulfamethoxypyridazine-specific single-chain antibody could be successfully generated by phage display technology. This antibody, which was selected from a human semisynthetic single framework scFv library (ETH-2) shows a high affinity to sulfamethoxypyridazine ( $K_D$   $7,74 \times 10^{-8}$  M) and the binding occurs competitively. The immobilization of sulfonamides was carried out by flexible linker molecules developed and tested during this work. With that an alternative route to the common derivatization of haptens with carrier proteins could be established.

Ideally such an antibody should be produced in a highly-efficient expression system. For that an expression system based on transgenic plants is particularly suitable. To achieve this a *N. tabacum* based model system for the heterologous expression of recombinant single-chain antibodies was developed during this work. The transformation of *N. tabacum* with a model scFv construct could be successfully performed and the recombinant protein was isolated from T<sub>1</sub>-plants and immunobiochemically proved.

Keywords: scFv, phage display, sulfonamides

**Inhaltsverzeichnis**

Zusammenfassung.....	i
Abstract .....	ii
Inhaltsverzeichnis .....	iii
Abkürzungsverzeichnis .....	ix
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Sulfonamide.....	1
1.2 Antikörper .....	4
1.3 Poly- und monoklonale Antikörper, rekombinante Antikörper .....	5
1.4 Antikörpergenbibliotheken .....	7
1.5 „Phage Display“ und „Panning“ .....	9
1.6 Hapten-spezifische Antikörper .....	12
1.7 Heterologe Expression rekombinanter Antikörper in transgenen Pflanzen.....	13
1.8 Aufgabenstellung.....	16
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>17</b>
2.1 Material.....	17
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme .....	17
2.1.2 Puffer und Lösungen .....	17
2.1.3 Medien.....	18
2.1.4 Antibiotika .....	18
2.1.5 Bakterienstämme und Vektoren.....	18
2.1.6 Antikörpergenbibliotheken .....	19
2.1.7 Helferphagen .....	21
2.1.8 Antikörper .....	22
2.1.9 Oligonukleotide .....	22
2.1.10 Molekulargewichtsmarker .....	23
2.1.11 Verwendete Kits.....	24
2.1.12 Sulfonamide.....	24
2.1.13 „Magnetic beads“ .....	24

2.1.14 Biotin-Linker Moleküle .....	24
2.1.15 Thiol-Linker Moleküle.....	25
2.1.16 Material für Biacore-Analysen.....	26
2.2 Molekularbiologische Methoden .....	26
2.2.1 Anzucht von Bakterien.....	26
2.2.2 Bestimmung der optischen Dichte (OD <sub>600</sub> ) einer Bakterienkultur.	26
2.2.3 Anlegen von Glycerinstocks .....	26
2.2.4 Isolation von Plasmiden aus Bakterienkulturen .....	27
2.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen .....	27
2.2.6 Herstellung Hitzeschock-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	27
2.2.7 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen .....	27
2.2.8 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen durch Hitzeschock ....	27
2.2.9 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen durch .....	
Elektroporation .....	28
2.2.10 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> vermittelte Transformation.....	
von <i>Nicotiana tabacum</i> .....	28
2.2.11 Isolation genomischer DNA aus <i>N. tabacum</i> .....	29
2.2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
2.2.13 Kolonie-PCR .....	30
2.2.14 Restriktionsverdau .....	30
2.2.15 Dephosphorylierung geschnittener DNA.....	31
2.2.16 Ligation .....	31
2.2.17 Agarose-Gelelektrophorese .....	31
2.2.18 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen .....	31
2.2.19 Aufreinigung von PCR-Ansätzen .....	31
2.2.20 Sequenzierung.....	31
2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	32
2.3.1 Expression löslicher scFv-Antikörper.....	32
2.3.2 Isolation löslicher scFv-Antikörper aus dem Kulturüberstand .....	
oder der periplasmatischen Fraktion von <i>E. coli</i> .....	32
2.3.3 Native Proteinisolation aus Pflanzen ( <i>N. tabacum</i> ).....	33
2.3.4 Aufreinigung von His-markiertem scFv über Ni-NTA IMAC .....	33
2.3.5 Aufreinigung von rekombinantem scFv über Protein A-.....	
Affinitätschromatographie .....	34

2.3.6 Einengen und Umpuffern von aufgereinigten scFv-Proben .....	35
2.3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	35
2.3.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	35
2.3.9 Coomassiefärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen ...	35
2.3.10 Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen .....	35
2.3.11 Western Blot .....	36
2.3.12 Ponceaufärbung und Blotabsättigung.....	36
2.3.13 Immunfärbungen.....	36
2.4 Methoden zur Selektion von rekombinanten Antikörpern .....	36
2.4.1 Exponentiell wachsende <i>E. coli</i> Kulturen für die Infektion mit.....	
scFv-Phagen .....	36
2.4.2 Phageninfektionen .....	37
2.4.3 Kopplung von Sulfamethoxypyridazin (SMP) an.....	
„magnetic beads“ (I) .....	37
2.4.4 Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an .....	
„magnetic beads“ (I) .....	37
2.4.5 Kopplung von Sulfamethoxypyridazin (SMP) an.....	
„magnetic beads“ (II) .....	38
2.4.6 Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an .....	
„magnetic beads“ (II) .....	38
2.4.7 Kopplung von Sulfanilamid (SA) und Sulfamethoxypyridazin .....	
(SMP) an ein Biotin-Linker Molekül .....	39
2.4.8 Selektion SA- und SMP-spezifischer scFv-Phagen an .....	
Streptavidin-gekoppelten Mikrotiterplatten .....	39
2.4.9 Kopplung von Sulfamethoxypyridazin (SMP) an ein .....	
synthetisches Thiol-Linker Molekül (I) .....	40
2.4.10 Kopplung von Sulfamethoxypyridazin (SMP) an ein .....	
synthetisches Thiol-Linker Molekül (II) .....	40
2.4.11 Selektion von SMP-spezifischen scFv-Phagen an Maleimid- .....	
aktivierten Mikrotiterplatten.....	40
2.4.12 Amplifikation der scFv-Phagen .....	42
2.4.13 PEG-Fällung der amplifizierten scFv-Phagen .....	42
2.4.14 Titerbestimmung von Phagensuspensionen.....	43
2.4.15 Analyse von selektierten scFv-Klonen über Immunfärbung .....	43



2.4.16 Analyse von selektierten scFv-Klonen über die Deoxycholat- methode .....	43
2.5 Massenspektrometrie .....	44
2.6 Bestimmung der Affinität von Antikörperfragmenten.....	44
2.6.1 Grundlagen der Biacore-Technologie .....	44
2.6.2 Kopplung der Sensor-Chips.....	46
2.6.3 Affinitätsmessungen .....	47
2.7 Computergestützte Bearbeitung und Auswertung von..... Biacore-Daten.....	47
2.8 Modellierung der Antikörperfragmente.....	48
2.9 Computergestützte Bearbeitung und Auswertung von..... DNA-Sequenzen.....	48
2.10 Molekulare Analyse der Sulfonamid-Konjugate .....	48
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
3.1 Die Antikörpergenbibliotheken.....	49
3.2 Immobilisierungsstrategien und Sulfonamid-Derivate.....	50
3.3 Selektion auf Antigen-spezifische scFv-Phagen.....	53
3.3.1 Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an SMP-gekoppelten..... SiMAG CI beads (Griffin.1 Bank) .....	53
3.3.2 Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an SMP-gekoppelten..... SiMAG TCI beads (ETH-2 Bank) .....	54
3.3.3 Selektion SA-spezifischer scFv-Phagen an Streptavidin- gekoppelten Mikrotiterplatten.....	55
3.3.4 Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an Streptavidin- gekoppelten Mikrotiterplatten.....	57
3.3.5 Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an Maleimid-..... aktivierten Mikrotiterplatten (SMP-Thiol Konjugat).....	58
3.3.6 Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an Maleimid-..... aktivierten Mikrotiterplatten (SMP-VBlink Konjugat) .....	60
3.4 Analyse der selektierten Klone .....	61
3.4.1 PCR-Analyse selektierter scFv-Klone.....	61
3.4.2 Expressions-Analyse selektierter scFv-Klone.....	63
3.4.3 Sequenz-Analyse selektierter scFv-Klone .....	65

3.5 Expression und Aufreinigung von scFv-Fragmenten .....	66
3.5.1 Isolation von scFv-Fragmenten aus der periplasmatischen .....	
Proteinfraktion von <i>E. coli</i> .....	67
3.5.2 Isolation von scFv-Fragmenten aus dem Kulturüberstand von .....	
<i>E. coli</i> Expressionskulturen .....	67
3.6 Analyse transformierter <i>N. tabacum</i> Pflanzen .....	68
3.6.1 PCR-Analyse transformierter <i>N. tabacum</i> Pflanzen.....	69
3.6.2 Native Isolation von rekombinantem T-SMP-19 scFv aus .....	
transformierten <i>N. tabacum</i> Pflanzen .....	71
3.6.3 Immunbiochemischer Nachweis des T-SMP-19 scFv.....	71
3.7 Charakterisierung selektierter scFv-Fragmente.....	73
3.7.1 Ligand Thiol Immobilisierung SH-Gruppen tragender Liganden .....	
an einen CM5 Chip.....	74
3.7.2 Affinitätsbestimmung des SMP-ETH K1 scFv.....	75
3.7.3 Affinitätsbestimmung des SMP-VBlink 50 scFv .....	78
3.7.4 Affinitätsbestimmung des T-SMP-19 scFv.....	81
3.8 Molekularbiologische Analyse der isolierten Klone .....	83
3.8.1 CDR3-Sequenzanalyse .....	83
3.8.2 Alignment von CDRH3 Sequenzen.....	84
3.9 Molekulare Analyse der Sulfonamid-Konjugate .....	86
3.10 Modellierung der 3D-Struktur von Antikörperfragmenten.....	88
 <b>4. Diskussion .....</b>	 <b>94</b>
4.1 Immobilisierung der Sulfonamide.....	96
4.2 Die Antikörpergenbibliotheken .....	99
4.3 Selektion Sulfonamid-spezifischer „single chain“ Fragmente .....	100
4.4 Expression und Aufreinigung der Antikörperfragmente .....	105
4.5 Molekularbiologische Analyse selektierter „single chain“ .....	
Fragmente .....	105
4.6 Expression des T-SMP-19 scFvs in <i>Nicotiana tabacum</i> .....	108
4.7 Charakterisierung selektierter „single chain“ Fragmente .....	110
4.7.1 Oberflächenplasmonresonanzanalyse.....	110
4.7.2 Sequenzvergleich .....	115
4.8 Modellierung der 3D-Struktur SMP-bindender scFvs.....	116

4.9	Abschlussdiskussion.....	117
4.10	Ausblick .....	119
<b>5.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>120</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

Amp	Ampicillin
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	“base pairs” (Basenpaare)
BSA	„Bovine Serum Albumin“
CDR	„Complementary Determining Region“
cfu	“colony forming units”
CHO	„Chinese hamster ovary“
CI	Chloroform/Isoamylalkohol
CMC	N-Cyclohexyl-N'(2-morpholinoethyl) carbodiimid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Deoxyribonucleic acid“
DOC	Deoxycholat
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino) propyl]-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
Fab	„Fragment antigen binding“
Fc	„Fragment cristallizable“
Fv	„Fragment variable“
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HBS-EP	HEPES-gepufferte Salzlösung mit EDTA und P20
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
6xHis	6x Histidin
HPLC	„High performance liquid chromatography“
IMAC	immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
kDa	kilo Dalton
kV	kilo Volt
Ig	Immunglobulin
LC	„Liquid Chromatography“
LC-MS	Kopplung von HPLC und MS

MES	N-Morpholinoethan Sulfonsäure
min	Minuten
mM	Millimolar
MM	Minimal Medium
M-PBST	Milchpulver-PBST
MRL	„Maximum Residue Limit“
MS	Massenspektrometrie
NBT	Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
µl	Mikroliter
NHS	N-Hydroxysuccinimide
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	„Nuclear Magnetic Resonance“
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
OD	Optische Dichte
OSP	Osmotische Schock Präparation
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PBST	PBS-Tween 20
PCR	„Polymerase chain reaction“
PDEA	“2-(2-pyridinyldithio)ethaneamine hydrochloride”
PEG	Polyethylenglycol
PPP	Periplasmatische Proteinfraction
PPT	Phosphinotricin
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RT	Raumtemperatur
RU	„Resonance Unit“
s	Sekunden
SA	Sulfanilamid
ScFv	„Single chain Fragment variable“
SDS	„Sodium Dodecyl Sulfate“
SMP	Sulfamethoxypyridazin
SPR	„Surface Plasmon Resonance“
TE	Tris HCl/EDTA

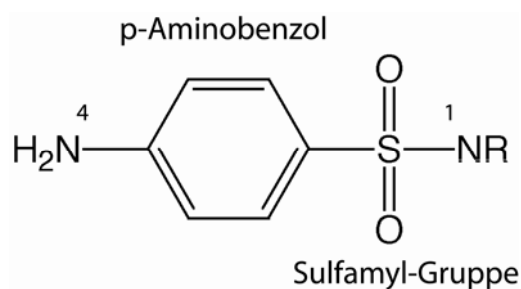
---

T-DNA	„transferred“ DNA
Ti-Plasmid	„Tumor-inducing“ Plasmid
TLC	„Thin Layer Chromatography“
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
V <sub>H</sub>	Variable Domäne der schweren Kette
V <sub>L</sub>	Variable Domäne der leichten Kette
v/v	Volumenanteile/Volumen
w/v	Gewichtsanteile/Volumen

## 1. Einleitung

### 1.1 Sulfonamide

Unter Sulfonamiden versteht man eine Gruppe antibiotisch wirksamer Verbindungen, deren Wirkung auf einer kompetitiven Inhibition der Dihydropterinsäure-Synthetase, des ersten entscheidenden Enzyms innerhalb des bakteriellen Folsäure-Metabolismus beruht. Diese Wirkung wird durch die strukturelle Analogie zur p-Aminobenzoessäure, des originären Substrats der Dihydropterinsäure-Synthetase bedingt (Madigan *et al.* 2001). Da Folsäure als Vorläufer in die Purinsynthese eingeht, wird letztlich die Nucleinsäuresynthese der Bakterien inhibiert (Madigan *et al.* 2001). Alle Sulfonamid-Antibiotika sind N<sup>1</sup>-substituierte Derivate des p-Aminobenzensulfonamids (Sulfanilamid, Abb.1.1) und somit strukturell verwandt (Korpimäki *et al.* 2002).



**Abb. 1.1 Allgemeine Sulfonamid-Struktur**

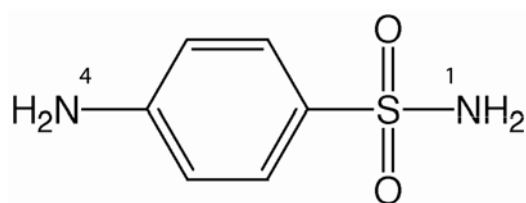
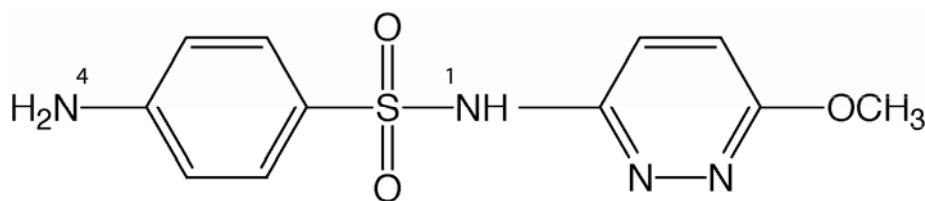
Sulfonamide werden in der Humanmedizin zur Behandlung bakterieller Infektionen verwendet, darunter häufig Atemwegs- und Urogenitalinfektionen. Darüber hinaus werden sie in der Veterinärmedizin zu therapeutischen und prophylaktischen Zwecken sowie als Wachstumsförderer eingesetzt (Cliquet *et al.* 2003, Korpimäki *et al.* 2003, Long *et al.* 1990). Als Konsequenz sind Sulfonamid-Rückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft nachweisbar (Franco *et al.* 1990) und stellen ein Gesundheitsrisiko für den Verbraucher insbesondere hinsichtlich einer möglichen Resistenzentwicklung pathogener Mikroorganismen dar (Sheth and Sporns 1991). Untersuchungen zeigten, dass bei 5 % der mit Sulfonamiden behandelten Patienten unerwünschte Effekte auftraten (Barnes *et al.* 1990). Um die Risiken für den Verbraucher gering zu

halten, sind sog. „maximum residue limits“ (MRL) gesetzlich festgelegt worden. Innerhalb der EU liegt das MRL für den Gesamt-Sulfonamidgehalt in essbaren Geweben und Milch bei 100 µg/kg (EU 1999), in Japan hingegen bei nur 20 µg/kg (Cliquet *et al.* 2003). Es existieren eine Reihe konventioneller Detektionsmethoden für eine Anzahl verschiedener Sulfonamide darunter Bioassays, Kapillarelektrophorese, Dünnschichtchromatographie (TLC), Gaschromatographie und „high performance“ Flüssigkeitschromatographie (HPLC, LC-MS/MS) (Cliquet *et al.* 2003, Korpimäki *et al.* 2004, Spinks *et al.* 2002). Diese Verfahren weisen zwar überwiegend eine hohe Sensitivität und Spezifität auf, sind jedoch sehr aufwändig und kostenintensiv, so dass sie für die parallelisierte Analyse einer großen Anzahl von Proben nicht geeignet sind (Cliquet *et al.* 2003). Aufgrund der hohen Sensitivität von Antigen-Antikörper-Reaktionen und des vergleichsweise geringen Aufwandes, den immunologische Nachweisverfahren erfordern, stellen Sulfonamid-spezifische Antikörper ein ideales Mittel zur Rückstandskontrolle in Lebensmitteln dar. Seit Anfang der 1990er Jahre wurden daher Immunoassays, basierend auf polyklonalen und monoklonalen Voll-längen-Antikörpern entwickelt, die jeweils hoch spezifisch für einzelne Sulfonamide sind (Cliquet *et al.* 2003, Märklbauer *et al.* 1992, Verheijen *et al.* 1998).

Aus immunologischer Sicht stellen Sulfonamide aufgrund ihrer strukturellen Einfachheit und geringen Größe Haptene dar (Spinks *et al.* 1999). Darunter versteht man niedermolekulare Verbindungen mit einer molekularen Masse von weniger als 1000-10000 Da, die zwar antigen, jedoch an sich nicht immunogen sind (Spinks *et al.* 1999). Für die Generierung Hapten-spezifischer Antikörper ist eine Derivatisierung oder Immobilisierung der Verbindungen unabdingbar. Die Art und Weise, wie diese Modifikation erfolgt, ist entscheidend für die Eigenschaften des resultierenden Antikörpers (Spinks *et al.* 1999). Allen Sulfonamiden gemeinsam ist der p-Aminobenzol-Ring-Rest und die damit verbundene Sulfofunktion (Abb. 1.1), die entscheidend für ihre biologische Wirkung sind (Haasnoot *et al.* 2000, Muldoon *et al.* 1999). N<sup>4</sup>-substituierte Sulfonamide sind inaktiv, während N<sup>1</sup>-substituierte Sulfonamide antimikrobielle Aktivität unterschiedlichen Ausmaßes aufweisen (Haasnoot *et al.* 2000). Die überwiegend durchgeführte Derivatisierung der Sulfonamide über die aromatische Aminogruppe in der N<sup>4</sup> Position führt zur Generierung von

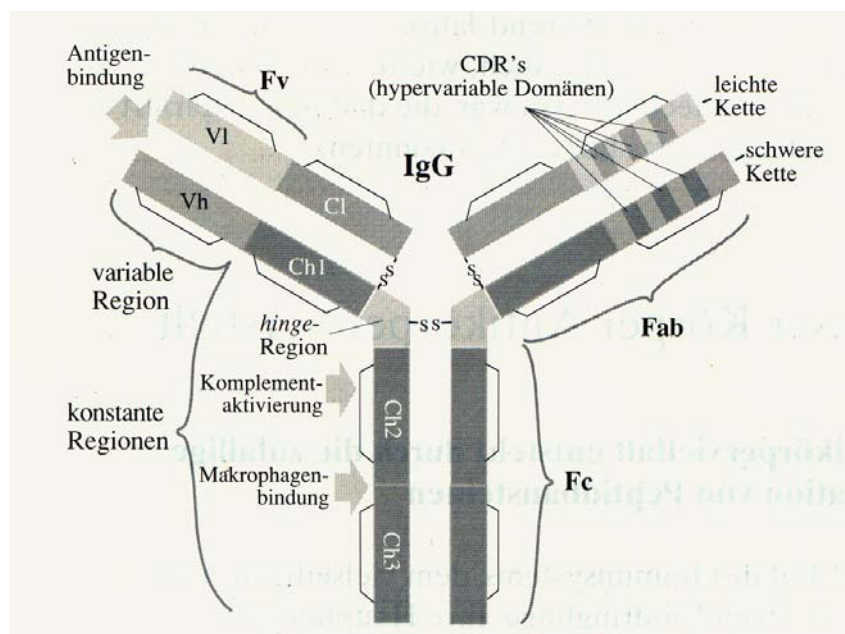


Antikörpern, welche sehr spezifisch für ein einzelnes Sulfonamid sind. Eine andere meist aufwändigere Vorgehensweise, die erstmals von Sheth und Sporns (1991) beschrieben wurde, erhält den p-Aminobenzol-Ring-Rest, indem die Derivatisierung über das N<sup>1</sup>-Sulfonamid-Ringsystem (s. Abb. 1.2, SMP) durchgeführt wird. Dadurch lassen sich Antikörper generieren, die eine höhere Kreuzreaktivität mit anderen Sulfonamiden aufweisen, was je nach Anwendung wünschenswert sein kann (Cliquet *et al.* 2003, Haasnoot *et al.* 2000, Muldoon *et al.* 1999). Ein vollständig optimierter Gruppen-spezifischer Antikörper für die sensitive Detektion von Sulfonamiden konnte bislang nicht hergestellt werden. Für eine spezifische und selektive Detektion bedarf es nach wie vor eines für die jeweilige Verbindung hochspezifischen Antikörpers. Ein solcher Antikörper im rekombinanten scFv Format ist für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur *in vitro* Selektion verwendeten Sulfonamide ebenfalls noch nicht beschrieben. Dabei handelte es sich zum einen um das kleinste Sulfonamid Sulfanilamid (M<sub>w</sub> 172,2 Da) zum anderen um das Sulfamethoxypyridazin (M<sub>w</sub> 280,3 Da), welches N<sup>1</sup>-substituiert einen Methoxy-substituierten Pyridazinring trägt (Abb. 1.2). Beide Sulfonamide wurden aufgrund des Vorhandenseins potentieller Derivatisierungsstellen ausgewählt. Die Immobilisierung der Moleküle erfolgte sowohl über die aromatische Aminogruppe in der N<sup>4</sup> Position, als auch über die N<sup>1</sup> Gruppe selbst (SA) bzw. die N<sup>1</sup>-substituierte pyridazinring-ständige Methoxygruppe (SMP).

**Sulfanilamid (SA)**M<sub>w</sub> 172,2 Da**Sulfamethoxypyridazin (SMP)**M<sub>w</sub> 280,3 Da**Abb. 1.2. Liganden. Sulfanilamid (SA) und Sulfamethoxypyridazin (SMP)**

## 1.2. Antikörper

Antikörper oder Immunglobuline (Ig) sind ursprünglich Bestandteile des humoralen Immunsystems höherer Wirbeltiere und werden als Reaktion auf in den Körper eingedrungene Fremdstoffe gebildet. Diese Fremdstoffe können z.B. Pathogene wie Bakterien, Viren und Pilze oder Teile von diesen sein (Janeway und Travers 1997). Antikörpermoleküle haben eine gemeinsame einheitliche Struktur aus vier Polypeptidketten, zwei identische leichte (L-) Ketten (~ 25 kDa) und zwei identische schwere (H-) Ketten (~50 kDa) (Abb. 1.3)



Quelle: Breitling und Dübel 1997

**Abb. 1.3 Struktur eines Immunglobulin G**

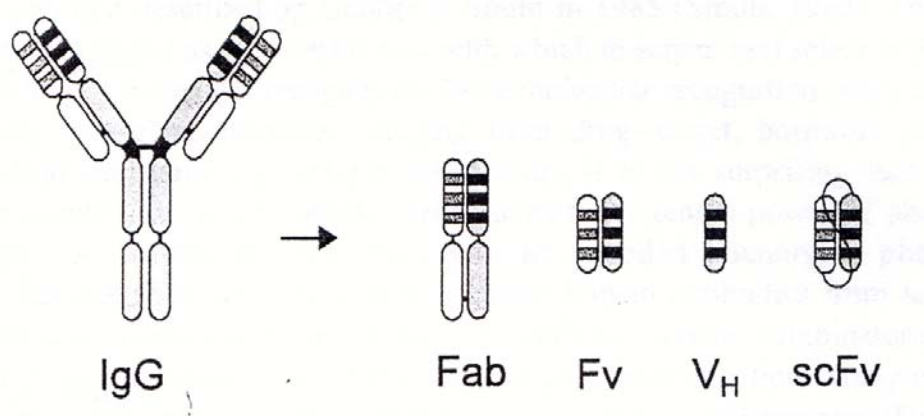
Jede leichte Kette ist über eine Disulfidbrücke sowie nicht-kovalente Interaktionen wie Salzbrücken, Wasserstoffbrücken und hydrophobe Bindungen mit einer schweren Kette zu einem Heterodimer verbunden (Goldsby *et al.* 2003). Jede der vier Ketten lässt sich in einen konstanten (C-) Teil und einen variablen (V-) Teil unterteilen. Der konstante Teil einer jeden schweren Kette ist in die drei Regionen C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 und C<sub>H</sub>3 unterteilt. Die C<sub>H</sub>2 und C<sub>H</sub>3 Regionen sind über eine Disulfidbrücke und nicht-kovalente Interaktionen zum sog. Fc-Teil verbunden, der wesentlich zur Stabilität des Heterodimers beiträgt und über den die Aktivierung des Immunsystems erfolgt. Es gibt fünf verschiedene Klassen von Antikörpern IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, die sich durch die Klasse der H-Ketten unterscheiden ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , und  $\mu$ ). IgG Moleküle besitzen  $\gamma$ -Ketten.

Die variablen Regionen der leichten ( $V_L$ ) und schweren ( $V_H$ ) Kette treten in Kontakt mit dem Antigen. Jede der variablen Ketten besteht aus drei hypervariablen Regionen. Diese sind kurze Peptidabschnitte von etwa 5 bis 15 Aminosäuren, die eine extrem hohe Sequenzvariabilität aufweisen (Breitling und Dübel 1997). Sie bilden die eigentliche Kontaktstelle zum Antigen, indem sie eine Struktur ausbilden, die komplementär zu diesem ist. Daher werden sie Komplementaritäts-determinierende Regionen oder CDR („complementary determining regions“) genannt. Der restliche Teil der variablen Regionen weist eine deutlich geringere Variabilität in der Aminosäuresequenz auf. Die sehr rigiden  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die in diesen Gerüstregionen („framework“) ausgebildet werden, tragen wesentlich zur Stabilisierung der räumlichen Struktur der CDRs bei. Das Antikörperrepertoire eines Säugetiers umfasst mindestens  $10^{11}$  Antikörper unterschiedlicher Spezifität. Die Diversität entsteht während der Differenzierung der B-Lymphozyten durch somatische Rekombination separater Gensegmente und somatische Hypermutation. Die Keimbahn-DNA eines einzelnen Menschen enthält für die schwere Kette 51  $V_H$ , 25  $D$ , 6  $J_H$  und für die leichte Kette 40  $V_K$ , 5  $J_K$ , 31  $V_\lambda$  und 4  $J_\lambda$  Gensegmente (Goldsby *et al.* 2003).

### 1.3 Poly- und monoklonale Antikörper, rekombinante Antikörper

Die klassische Methode zur Herstellung von Antikörpern definierter Spezifität beruht auf der wiederholten Immunisierung von Versuchstieren mit einem Antigen (Breitling und Dübel 1997). Das resultierende Antiserum enthält den gesuchten Antikörper als polyklonales Gemisch aus Antikörpern unterschiedlicher Spezifitäten. Polyklonale Seren haben daher den Nachteil der Neigung zur Kreuzreaktivität (Bradbury *et al.* 2003). Spätestens mit der Entwicklung der Hybridoma-Technologie (Köhler und Milstein 1975) gelangten Antikörper zu einer breiten Anwendung in der medizinischen und wissenschaftlichen Diagnostik und der Biotechnologie. Durch Fusion eines B-Lymphozyten definierter Spezifität mit einer Myelomzelle gelang die *in vitro* Herstellung monoklonaler Antikörper. Wesentlicher Nachteil dieser Methode ist der hohe zeitliche und finanzielle Aufwand, der für die Erstellung und den Erhalt der Hybridomzelllinien notwendig ist (Bruce *et al.* 2002). Durch den Einsatz

molekularbiologischer Techniken ist seit Beginn der 1990er Jahre die Herstellung rekombinanter Antikörper sowie Antikörperfragmente möglich (Winter und Milstein 1991), die vollständig *in vitro* generiert werden können (Breitling und Dübel 1997). Dabei werden Antikörpergene direkt aus Lymphozyten kloniert und beispielsweise in Bakterien exprimiert. Antikörperfragmente (Abb. 1.4) wie zum Beispiel Fab-Fragmente (ca. 50 kDa) oder bivalente  $F(ab)_2$ -Fragmente (ca. 100 kDa) konnten zuvor nur mittels Proteaseverdau hergestellt werden (Janeway und Travers 1997). Die Herstellung kleinerer antigenbindender Fragmente wie des Fv-Fragments (ca. 25 kDa, Abb 1.4) durch Proteaseverdau war hingegen schwierig bis unmöglich (Plückthun 1990).



Quelle: Yau *et al.* 2003

**Abb. 1.4 Antikörperfragmente**

Antikörperfragmente haben gegenüber Volllängen-Antikörpern (IgG: ca. 150 kDa) entscheidende Vorteile unter anderem hinsichtlich ihrer Exprimierbarkeit in heterologen Systemen oder ihrer Penetrationsfähigkeit von Geweben. Die kleinste antigenbindende Einheit, das Fv-Fragment, welches nur noch aus den variablen Domänen einer leichten ( $V_L$ ) und einer schweren Kette ( $V_H$ ) besteht (Abb 1.4), ist nicht über Disulfidbrücken verbunden und somit im Vergleich zu Fab-Fragmenten relativ instabil (Breitling und Dübel 1997). Durch die Entwicklung der „single chain Fragment variables“ (scFv) konnte eine Stabilisierung der beiden variablen Domänen erreicht werden (Bird *et al.* 1988, Huston *et al.* 1988). Dabei wurde der Carboxy-Terminus der  $V_L$  Region über einen flexiblen Linker aus 14-24 Aminosäuren mit dem Amino-Terminus der  $V_H$

Region verbunden. Somit lassen sich beliebige  $V_H$  und  $V_L$  Regionen miteinander kombinieren (Marks *et al.* 1991, Winter und Milstein 1991). Ein Nachteil von scFv-Fragmenten liegt in ihrer Neigung, konzentrationsabhängig zu Dimeren oder Oligomeren zu aggregieren (Wörn und Plückthun 2001). Jedoch ist dieses Verhalten auch von der Art der verwendeten Keimbahngene abhängig (Ewert *et al.* 2003).

#### 1.4 Antikörpergenbibliotheken

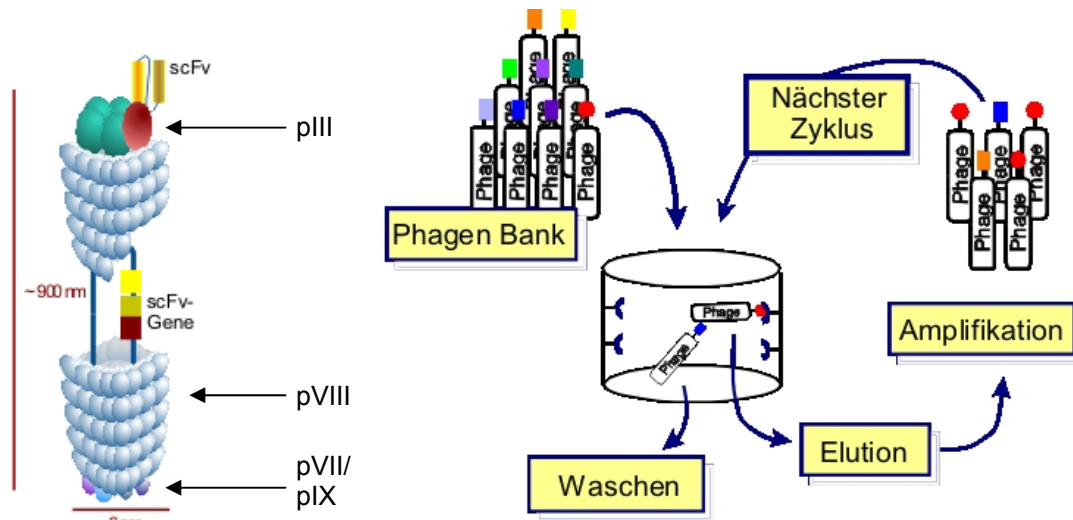
Die Etablierung der rekombinanten Antikörpertechnologie ging einher mit der PCR-basierten Entwicklung von Antikörpergenbibliotheken, deren Funktion die Bereitstellung eines möglichst komplexen Antikörperrepertoires für die *in vitro* Selektion war. Grundsätzlich lassen sich sogenannte universelle oder „single pot“ Bibliotheken von post-Immunisierungs-Bibliotheken unterscheiden (Hust und Dübel 2004). Die Amplifikation der variablen (V) Gene von IgG-sezernierenden Plasmazellen immunisierter Spender resultiert in post-Immunisierungs-Bibliotheken (Clackson *et al.* 1991), während universellen Bibliotheken Antikörpergen-Material nicht-immunisierter, gesunder Spender zugrunde liegt (Hust und Dübel 2004). „Single pot“ Bibliotheken lassen sich je nach Herkunft der verwendeten Antikörpergene in naive, semi-synthetische und synthetische Bibliotheken unterteilen (Hoogenboom 1997, Hust und Dübel 2004). Naiven Bibliotheken liegt das rearrangierte V-Gen Repertoire der IgM mRNA nicht-immunisierter Spender zugrunde, das aus peripheren Blut-Lymphozyten isoliert wird (de Haard *et al.* 1999, Marks *et al.* 1991). Ein wesentlicher Vorteil dieser Form der Bibliothek liegt in ihrer universellen Anwendbarkeit für die Selektion von Antikörpern gegen alle denkbaren Antigene, darunter solcher gegen nicht-immunogene oder toxische Substanzen sowie körpereigene (Selbst-) Antigene (Hoogenboom 1997). Entscheidende Nachteile sind der hohe Aufwand, den die Herstellung einer naiven Genbibliothek von ausreichender Größe erfordert, sowie vor allem die durch die fehlende Kontrollierbarkeit der in der Bibliothek enthaltenen V-Gene möglicherweise beeinflusste Diversität und Qualität der Bank (Hoogenboom 1997). Semisynthetische bzw. synthetische Antikörpergenbibliotheken bestehen aus nicht-rearrangierten V-Genen aus prä-B-Zellen (Keimbahnzellen)

(Hoogenboom und Winter 1992) oder aus einem einzelnen Antikörper-„framework“ mit genetisch randomisierten CDR Sequenzen (Pini *et al.* 1998). Häufig werden zusätzlich vollständig synthetische Bibliotheken unterschieden (Hust und Dübel 2004). Diese haben eine humane „framework“ Region, in die vollständig randomisierte CDRs eingesetzt wurden (Knappik *et al.* 2000). Die CDR3 Region insbesondere der schweren Kette (CDRH3) weist eine ausgesprochen hohe Diversität in der Länge und der Aminosäuresequenz auf und ist zusammen mit der CDR3 Region der leichten Kette (CDRL3) maßgeblich an der initialen Bindung an das Antigen beteiligt (Padlan 1994). Aus diesem Grund wurden viele semisynthetische Bibliotheken erstellt, in denen hauptsächlich die CDR3 Regionen teilweise oder vollständig randomisiert wurden (Braunagel und Little 1997). Dies war auch bei einer im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Banken, der „single framework“ Bibliothek ETH-2 (Pini *et al.* 1998, Viti *et al.* 2000) der Fall. Der Vorteil einer „single framework“ Bibliothek liegt in der möglichen Verwendung von Keimbahngenen, die in Bezug auf Stabilität und Expressionsverhalten optimal sind. Ein Nachteil dieser Banken ist die auf die CDR3 Regionen begrenzte Diversität des Antikörperrepertoires. Es existiert ein klarer Zusammenhang zwischen der Größe des Antikörperrepertoires und den Affinitäten der Antikörper, die daraus isoliert werden (Hust und Dübel 2004, Little *et al.* 1999). Aus frühen Bibliotheken, die etwa  $10^7$  unabhängige Klone aufwiesen (Marks *et al.* 1991), konnten Antikörper gegen Proteine generiert werden, deren Affinitäten im mikromolaren Bereich lagen. Größere Bibliotheken im Bereich von  $10^9$ - $10^{10}$  unabhängigen Klonen führten zu spezifischen Antikörpern, deren Affinitäten höher als  $10^{-8}$  M lagen (Griffith *et al.* 1994, Sheets *et al.* 1998). Bis heute können Antikörpergenbibliotheken mit einer Diversität von bis zu  $10^{11}$  unabhängigen Klonen hergestellt werden (Sblattero und Bradbury 2000). Jedoch ist die Größe der Bibliothek nicht das einzige entscheidende Kriterium, sondern vor allem die Komplexität bezüglich der intrinsischen Diversität und Funktionalität der Klone (Little *et al.* 1999). Unter den „Display“-Technologien zur Selektion rekombinanter Antikörper hat sich das „Phage Display“ unter Verwendung von Phagen-Antikörpergenbibliotheken als gebräuchlichste Methode herausgestellt (Bradbury *et al.* 2003).

### 1.5. „Phage Display“ und „Panning“

Das „Phage Display“ gehört wie auch das „Yeast two-hybrid system“ zu den gebräuchlichsten und am weitesten differenzierten Methoden für die schnelle Identifizierung, Charakterisierung und potentielle Verbesserung unter anderem von Protein-Protein-Interaktionen (Amstutz *et al.* 2001). Zusammen mit weiteren Methoden gehört es in die Gruppe der „Display“-Technologien, die ganz allgemein die Selektion spezifischer Binder aus großen Bibliotheken bindender Liganden über den Verlauf von mehreren Selektionszyklen ermöglichen (Bradbury *et al.* 2003). Andere „Display“ Technologien sind zum Beispiel das „Bacterial Surface Display“ (Daugherty *et al.* 1998), das „Ribosome Display“ (Hanes und Plückthun 1997) oder das „Yeast Surface Display“ (Boder und Wittrup 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das „Phage Display“ zur Selektion antigenspezifischer „single chain“ Antikörper aus einer Antikörpergenbibliothek verwendet. Grundlage dafür bilden die Arbeiten von Smith (1985), durch die es möglich wurde, Fremdproteine wie Antikörperfragmente (McCafferty *et al.* 1990) auf der Oberfläche von filamentösen Bakteriophagen (M13, fd, f1) zu präsentieren. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Phagen-Antikörpergenbibliotheken basieren auf M13-Phagen Derivaten. Diese verlangsamen das Wachstum von *E. coli* Zellen, führen aber nicht zu deren Lyse. Ihr Genom wird durch eine ca. 6500 bp große zirkuläre DNA repräsentiert und sie zeichnen sich durch eine relativ einfach gebaute Proteinhülle aus (Abb. 1.5.). Diese besteht aus ca. 2700 Molekülen des pVIII Proteins („major coat protein“) und je fünf Moleküle der pVII, pIX, pVI und pIII Proteine (Breitling und Dübel 1997). Das pIII („minor coat protein“) befindet sich an der Spitze des Bakteriophagen und ist für die Bindung an die F-Pili von F' *E. coli* Zellen verantwortlich, über die die Infektion der Zellen stattfindet. Insbesondere an dem pIII Protein können fremde Proteinsequenzen integriert werden, ohne dessen Funktion stark zu beeinträchtigen (Smith 1985). In den hier verwendeten Antikörpergenbibliotheken liegen die scFv-Gene im Leseraster mit dem 5' Ende des *genIII* (N-Terminus von pIII) vor. Im Zuge der Bildung löslicher Phagen wird das scFv Protein als pIII-Fusionsprotein auf der Oberfläche des (scFv-) Phagen exprimiert, während das genetische Material des Klons innerhalb des Phagen vorliegt. Diese Kopplung zwischen Genotyp

und Phänotyp stellt eines der wesentlichsten Prinzipien des „Phage Displays“ dar und erlaubt unter Verwendung von immobilisiertem oder markiertem Antigen die Anreicherung antigenspezifischer Phagen (Hoogenboom 1997). Der Prozess der Selektion auf antigenspezifische scFv-Phagen wird als „Panning“ bezeichnet (Breitling und Dübel 1997) und setzt sich aus mehreren aufeinander folgenden Schritten (Willats 2002) zusammen, die in Abb. 1.5 schematisch dargestellt sind.



**Abb. 1.5. ScFv-Phage und schematische Darstellung des Pannings**

Zunächst erfolgt die Immobilisierung des Antigens. Dieses kann beispielsweise an Immunoröhrchen (Marks *et al.* 1991), an „magnetic beads“ (Bracci *et al.* 2001, Gaskin *et al.* 2001) oder in Vertiefungen von Mikrotiterplatten (Brabas III *et al.* 1991) erfolgen. Die Literaturlage legt nahe, dass „magnetic beads“ vor allem hinsichtlich der Effizienz des Pannings Vorteile gegenüber Mikrotiterplatten haben (McConnell *et al.* 1999). Generell steht bei der Verwendung von „magnetic beads“ eine größere Oberfläche zur Immobilisierung der Antigene zur Verfügung (McConnell *et al.* 1999), und die Antigene liegen trotz Immobilisierung „in Lösung“ vor („batch“ Verfahren), was insbesondere für die Präsentation kleiner Moleküle von Bedeutung ist. Weiterhin erhöht sich bei der Verwendung von Mikrotiterplatten, insbesondere wenn diese mit Trägerproteinen wie zum Beispiel Streptavidin beschichtet sind, die Möglichkeit der unspezifischen Bindung an diese Matrix beträchtlich. Um diesem Effekt entgegen zu wirken, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit



bei Bedarf Präselektionen an der unspezifischen Bindungsmatrix durchgeführt (Lauer *et al.* 2005, O'Brien und Aitken 2001). Die eigentlichen Selektionen erfolgten dann mit dem präselektierten Phagenrepertoire.

Im Anschluss an die Immobilisierung wird das scFv-Phagenrepertoire zugegeben und den Phagen durch Inkubation eine Bindung an das immobilisierte Antigen ermöglicht. Um unspezifisch oder mit niedriger Affinität gebundene scFv-Phagen zu entfernen, folgen mehrere Waschschriffe, deren Stringenz für unterschiedliche Selektionsverfahren zu optimieren ist. Anschließend werden die gebundenen scFvs eluiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte dieses über einen pH-„shift“ in den sauren Bereich. Des Weiteren kann auch im alkalischen Bereich, durch hochkonzentrierte Salzlösungen oder durch Konkurrenz mit dem freien Antigen eluiert werden. Mit den eluierten scFv-Phagen werden *E. coli* Zellen re-infiziert und das Phagemid in diesen amplifiziert. Die Herstellung löslicher scFv-Phagen erfolgt unter Infektion mit einem Helferphagen. Die so produzierten Phagenantikörper stellen ein Gemisch von Klonen unterschiedlicher Spezifität dar, in dem solche, die das zur Selektion eingesetzte Antigen erkennen, bereits angereichert vorliegen sollten. Diese Phagen werden für 2-5 weitere Selektionsrunden eingesetzt, über die der Anteil antigenspezifischer scFvs sukzessive zunehmen sollte (Breitling und Dübel 1997). Allerdings wirken im Verlauf des „Pannings“ zwei prinzipiell gegenläufige Faktoren, die das Erreichen idealer Selektionsbedingungen unmöglich machen, wodurch allenfalls ein Optimum erreicht werden kann: Aufgrund einer Wachstumskonkurrenz zwischen den in der Population vorliegenden scFv-Klonen wird mit zunehmender Anzahl an Selektionsrunden nicht nur auf antigenspezifische scFv-Phagen selektiert, sondern auch auf solche, die höhere Wachstumsraten in *E. coli* aufweisen. Diese sind häufig Klone, die unvollständige oder vollständig deletierte scFv Gene tragen (de Bruin *et al.* 1999, Tur *et al.* 2001). Zum Erhalt optimaler Selektionsbedingungen ist insbesondere die Kontrolle möglicher unspezifischer Bindungen entscheidend. Je spezifischer die Selektion verläuft, desto weniger Selektionsrunden werden zur Anreicherung antigenspezifischer scFv-Phagen benötigt und desto geringer sind somit die Probleme, die aus der Wachstumskonkurrenz resultieren.

## 1.6. Hapten-spezifische Antikörper

Antikörper gegen niedermolekulare Liganden sind für eine Vielzahl von Anwendungen von großem Interesse, darunter therapeutisches Monitoring bei Medikationen, Monitoring von Drogen- oder Medikamenten Missbrauch und Tests auf Vitamine, Hormone, Metabolite, Nahrungsmitteltoxine wie Mycotoxine, andere Nahrungsmittelkontaminanten und Umwelt-Schadstoffe (Moghaddam *et al.* 2001). Kritischer Punkt bei der Herstellung Hapten-spezifischer Antikörper ist ihre ausgesprochen geringe Antigenizität. Der klassische Weg zur Herstellung Hapten-spezifischer Antikörper nutzte die Hybridoma-Technologie, wobei die Haptene für die Immunisierung der Tiere an Trägersubstanzen wie BSA, Ovalbumin oder Biotin gekoppelt wurden. Auf diese Weise konnten eine Reihe Hapten-spezifischer monoklonaler Antikörper generiert werden (Haasnoot *et al.* 2000, Muldoon *et al.* 1999, Sheth and Sporns 1991). Limitiert wird diese Methode durch die Tatsache, dass einige Haptene trotz Kopplung an Träger-Substanzen nicht immunogen sind (Moghaddam *et al.* 2001) und dass die traditionelle Hybridoma-Technik eines hohen Zeit- und Kostenaufwandes bedarf (Charlton *et al.* 2001). Zudem besteht die Gefahr der bevorzugten Selektion sog. „interface binders“ (Charlton *et al.* 2001, Tuomola *et al.* 2000), das heißt solcher Klone, die bevorzugt die konjugierte Form des Haptens erkennen während das unkonjugierte Hapten nicht oder mit geringerer Affinität detektiert wird (Charlton *et al.* 2001, Moghaddam *et al.* 2001). Eine geeignete Alternative zu den monoklonalen Antikörpern stellte die Herstellung rekombinanter Antikörperfragmente mittels „Phage Display“ dar (Burmester *et al.* 2001). Hapten-spezifische Antikörper aus Phagen-Antikörpergenbibliotheken liegen meist im Fab- oder scFv-Format vor (Griffith *et al.* 1994, Marks *et al.* 1991). Verglichen mit monoklonalen Hapten-spezifischen Vollängen-Antikörpern haben diese Antikörperfragmente eine intrinsisch niedrigere Affinität und bedürfen daher nach der primären Selektion häufig einer Affinitätsreifung durch beispielsweise „error-prone“ PCR (Daugherty *et al.* 2000), „site-directed“ Mutagenese (Ho *et al.* 1989), bakterielle „mutator“ Stämme (Low *et al.* 1996) oder „chain shuffling“ (Schier *et al.* 1996). Die bisher beschriebenen Hapten-spezifischen Antikörperfragmente aus Phagen-Bibliotheken gehen im Wesentlichen auf eine der folgenden

Selektionsstrategien zurück. Einerseits erfolgte die Selektion Hapten-spezifischer Antikörperfragmente häufig aus post-Immunisierungs-Bibliotheken, für deren Herstellung Tiere mit dem entsprechenden Hapten-Konjugat immunisiert wurden. (Charlton *et al.* 2001). Eine weitere Methode war die Herstellung synthetischer Antikörpergenbibliotheken, denen das Genmaterial eines Hapten-spezifischen monoklonalen Antikörpers zugrunde lag (Korpimäki *et al.* 2002). Eine dritte Methode ist die vollständige *in vitro* Selektion aus universellen Antikörpergenbibliotheken, für die die Haptene zur Immobilisierung an feste Oberflächen wiederum an Trägersubstanzen wie BSA oder Biotin gekoppelt wurden (Marks *et al.* 1991, Nissim *et al.* 1994). Die genannten Selektionsstrategien implizieren alle das Risiko einer bevorzugten Selektion von „interface binders“ und die beiden zuerst genannten Bibliothek-Formate sind zudem sehr aufwändig in der Herstellung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, aus einem semi-synthetischen Antikörpergenrepertoire Hapten-spezifische scFv-Fragmente zu isolieren und zudem durch geeignete alternative Immobilisierungsverfahren das Risiko einer unspezifischen „interface“-Bindung zu minimieren. Der technische Aufwand, den die Erstellung eines semi-synthetischen Repertoires erfordert, ist vergleichsweise geringer und das Repertoire ist zudem einer breiteren Anwendung für die Selektion gegen mehrere verschiedene Liganden offen. Die beiden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Haptene Sulfanilamid ( $M_w$  172,2) und Sulfamethoxypyridazin ( $M_w$  280,3) liegen hinsichtlich ihrer Molekulargewichte im unteren Bereich der bislang zur Selektion auf spezifische scFv-Antikörper eingesetzten niedermolekularen Liganden. Zudem sind sie strukturell sehr einfach gebaut (Abb. 1.2), was eine sehr geringe Antigenizität nahe legt.

### **1.7. Heterologe Expression rekombinanter Antikörper in transgenen Pflanzen**

Die am besten etablierten Expressionssysteme für die Produktion rekombinanter Antikörper sind Säugetier-Zelllinien für Vollängen-Antikörper und Bakterien für Antikörperfragmente (Stoger *et al.* 2004). Säugetierzellen, insbesondere „Chinese hamster ovary“ (CHO) und Maus NS0 Myelom Zellen werden bevorzugt verwendet, da in ihnen die Faltung komplexer Proteine mit

mehreren Untereinheiten sehr effizient erfolgt und sie darüber hinaus ähnliche Glycosylierungsmuster aufweisen wie humane Zellen (Chu und Robinson 2001). Wesentlicher Nachteil dieser Kulturen ist, dass sie aufwändig und teuer in der Herstellung und Erhaltung sind, was die „large scale“ Produktion von Antikörpern limitiert. Darüber hinaus können sie Träger humaner Pathogene wie Viren oder Prionen oder onkogener DNA-Sequenzen sein (Fischer *et al.*, 1999a), was die Einhaltung hoher Sicherheits- und Qualitätsstandards notwendig macht. Bakterien wurden primär für die Produktion von „single chain“ Antikörperfragmenten verwendet, da diese Fragmente keiner Glycosylierung bedürfen (Stoger *et al.* 2004). In Bakterien wirkt hinsichtlich einer „large scale“ Produktion von scFv-Fragmenten unter anderem limitierend, dass diese bei höheren Konzentrationen zur Bildung von Dimeren und Oligomeren neigen (Wörn und Plückthun 2001) und dass sie eine toxische Wirkung auf Bakterienzellen haben können, die sich wachstumsbegrenzend auswirkt. Transgene Pflanzen haben hinsichtlich der heterologen Antikörperproduktion eine Anzahl von Vorteilen gegenüber Zellkultur-basierten Systemen (Stoger *et al.* 2004). Sie produzieren große Mengen an funktionalem Säugetierprotein (Fischer *et al.* 1999a), es ist einfach ein „scale up“ für die Massenproduktion zu erreichen (Daniell *et al.* 2001) und über die Mechanismen der pflanzlichen Gewebekultur sind die Zelllinien leicht zu immortalisieren und aufrecht zu erhalten (Hiatt und Ma 1992). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit herzustellenden Sulfonamid-spezifischen Antikörper sollten langfristig bei Rückstandskontrollen auf Sulfonamide in der Lebensmittelindustrie zur Anwendung gelangen. Die Herstellung großer Mengen an funktionalem „single chain“ Antikörper wäre somit wünschenswert. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit darüber hinaus versucht, ein Modellsystem für die Expression von scFvs in transgenem Tabak (*Nicotiana tabacum*) zu etablieren. Die Transformation der Tabakpflanzen erfolgte über *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer (de Block *et al.* 1984, Horsch *et al.* 1984, Horsch *et al.* 1985). Bei *Agrobacterium tumefaciens* handelt es sich um ein phytopathogenes Bodenbakterium, welches bereits 1907 als Auslöser für die Wurzelhalsgallen Erkrankung („crown gall disease“) dicotyledoner Pflanzen identifiziert wurde (Zupan *et al.* 2000). Die Induktion tumorartiger Wurzelhalsgallen ist auf die Fähigkeit von *A. tumefaciens* zurückzuführen, DNA, die auf einem sog. Ti-

Plasmid („tumor inducing“) vorliegt, in Pflanzenzellen zu transferieren („transferred“ DNA, T-DNA) (Ziemienowicz 2001). Die T-DNA ist definiert als ein Sequenzabschnitt, der auf dem Ti Plasmid zwischen zwei flankierenden 25 bp langen „direct repeats“ (LB „left border“, RB „right border“) liegt (Zupan *et al.* 2000). Die T-DNA wird unter bestimmten äußeren Bedingungen in die Pflanzenzelle transferiert und erfährt hier eine Integration in das pflanzliche Genom. Der Transfer wird vermittelt durch ebenfalls auf dem Ti-Plasmid codierte Virulenz- (*vir*) Gen-Produkte. Die auf dem T-DNA Segment liegenden tumorinduzierenden *onc*-Gene stimulieren die pflanzliche Zellteilung und führen letztlich zur Ausbildung der Wurzelhalsgalle (Zupan *et al.* 2000). Die Tatsache, dass jede beliebige DNA Sequenz zwischen den Bordersequenzen durch das *vir*-System transferiert wird, macht das *A. tumefaciens* System zu einem brauchbaren Werkzeug zur genetischen Veränderung von Pflanzen (Zupan *et al.* 2000). In der Pflanzenbiotechnologie werden sog. entwaffnete Ti-Plasmide zum Transfer von Fremdgenen verwendet. Diesen fehlen alle tumorinduzierenden *onc*-Gene, wobei die Fähigkeit zum Transfer der T-DNA durch die *vir*-Region erhalten bleibt (Steinbiß 1995).

Die Erstellung der Konstrukte zur *Agrobacterium*-vermittelten Transformation von *Nicotiana tabacum* erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit basierend auf dem binären Ti-Vektor pGII-229 aus der pGreen Vektorserie (Hellens *et al.* 2000a, <http://www.pgreen.ac.uk>). Dabei handelt es sich um ein rund 3 kb großes „high-copy“ Plasmid, welches die Fähigkeit zur Replikation in *E. coli* und *Agrobacterium* Stämmen besitzt (Hellens *et al.* 2000a). Die Replikation in Agrobakterien ist abhängig von einem zweiten (Helfer-) Plasmid: pSoup. Die Replikase *pSa Rep* ist pSoup codiert und wird dem pGreen Plasmid *in trans* zur Verfügung gestellt. Letzteres trägt den Replikationsursprung *pSa Ori* für die Replikation in Agrobakterien (Hellens *et al.* 2000a, Hellens *et al.* 2000b). Als Markergene sind auf dem pGII-229 Vektor zum einen eine Kanamycin-Resistenz, codiert durch das Neomycin Phosphotransferase II Gen (*aph31I/NptII neo*) für die Selektion in Bakterien vorhanden. Die Selektion der Pflanzen wird ermöglicht durch eine Phosphinotricin Resistenz, welche durch das Phosphinotricin Acetyltransferase codierende *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* bzw. das *pat*-Gen aus *Streptomyces viridochromogenes* vermittelt wird (Hellens *et al.* 2000a, <http://www.pgreen.ac.uk>). Der im Rahmen der

vorliegenden Arbeit verwendete pGIIIMH35S Vektor (Hust 2002) enthielt den konstitutiven 35S-Promotor des *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) und einen Potyvirus-Translationsverstärker (Abb. 3.14).

### 1.8. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, einen „single chain“ Antikörper (scFv) gegen die beiden Sulfonamide Sulfanilamid und Sulfamethoxypyridazin zu entwickeln und zu charakterisieren, der sich in Pflanzen exprimieren lässt. Dabei ist aufgrund der oben geschilderten Ausgangslage zu erwarten, dass sich einige wesentliche technische Herausforderungen stellen. Dies soll adressiert werden, indem ein Ansatz gewählt wird, bei dem verschiedene Antikörpergenbibliotheken, Ligandenimmobilisierungsverfahren und Expressionsverfahren erprobt und variiert werden, um neben dem angestrebten anti-SA-/SMP-scFv auch ein Verfahren zu entwickeln, welches die zukünftige Suche nach Antikörpern gegen niedermolekulare Liganden erleichtert, beschleunigt und mit höheren Erfolgsraten durchführbar macht.

## 2.1 Material

### 2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

Applichem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Fluka (Buchs SG, Schweiz), Karl Roth (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Genecraft (Lüdinghausen), Roche Diagnostics (Mannheim), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

### 2.1.2 Puffer und Lösungen

Tab. 2.1 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Menge	Substanz
Phosphatpuffer für TB*	23,1 g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
	125,4 g	$\text{K}_2\text{HPO}_4$
10 x M9*	60 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
	30 g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
	10 g	$\text{NH}_4\text{Cl}$
	5 g	$\text{NaCl}$
10 x PBS*	2,56 g	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
Gebrauch 1 x	14,90 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
	87,66 g	$\text{NaCl}$
	pH 7,4	
PBST	1 x	PBS
	0,05 % (v/v)	Tween 20
Blotto/M-PBST	1 x	PBS
	0,05 % (v/v)	Tween 20
	5 % (w/v)	Magermilchpulver
PE-Puffer	500 mM	Saccharose
	100 mM	Tris HCl
	1 mM	EDTA
	pH 8,0	

\*Angaben für 1L Puffer

### 2.1.3 Medien

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Medien wurden wie bei Sambrock *et al.* (1989) beschrieben hergestellt und anschließend durch Autoklavieren (20 min, 121 °C, 1 bar) sterilisiert.

### 2.1.4. Antibiotika

Tab. 2.2 Verwendete Antibiotika-Stammlösungen

Name	Lösungs- mittel	Extra	Lager- -ung	Stammkonz	Gerbrauchs- -konz.
Ampicillin	H <sub>2</sub> O	sterilfiltriert	-20 °C	100 mg/ml	100 µg/ml
Chlor- amphenicol	Ethanol abs.		-20 °C	34 mg/ml	34 µg/ml
Kanamycin	H <sub>2</sub> O	sterilfiltriert	-20 °C	50 mg/ml	50 µg/ml
Tetracyclin	Ethanol 70% (v/v)		-20 °C	5 mg/ml	50 µg/ml
Streptomycin	H <sub>2</sub> O	sterilfiltriert	-20 °C	50 mg/ml	50 µg/ml

### 2.1.5 Bakterienstämme und Vektoren

Tab. 2.3 Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm (Herkunft)	Genotyp
<i>E. coli</i> TG1 (MRC)	<i>supE44 thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (rK<sup>-</sup> mK<sup>+</sup>) F'[traD36 proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15]</i>
<i>E. coli</i> XL1-Blue (Stratagene)	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup> F'[proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> ZΔM15 TN10(tet<sup>r</sup>)]</i>
<i>E. coli</i> BLR(DE3) (Novagen)	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm Δ(srl-recA) 306::Tn10 (Tet<sup>r</sup>) (DE3)</i>
<i>E. coli</i> BLR(DE3)pLysS (Novagen)	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm Δ(srl-recA) 306::Tn10 (DE3) pLysS Cmp<sup>r</sup> Tet<sup>r</sup></i>
<i>E. coli</i> TB1 (Novagen)	<i>F<sup>-</sup> ara D(lac-proAB) rpsL F80lacZD M15 hsdR17(rK<sup>-</sup> mK<sup>-</sup>)</i>
<i>A. tumefaciens</i> EHA105 (Hood <i>et al.</i> , 1993)	

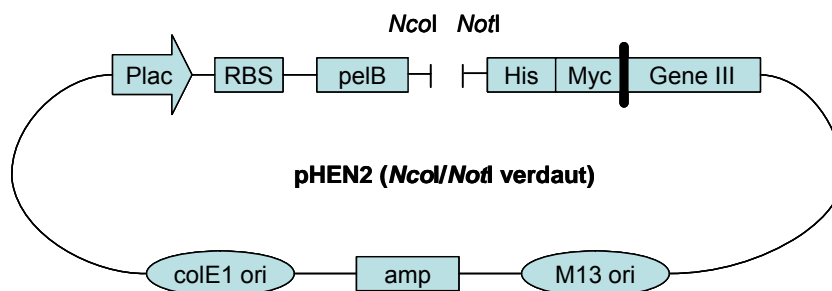


Es wurden folgende Vektoren verwendet :

pET 20b(+)	Novagen
pHEN2	Griffin.1 Antikörperbibliothek, MRC, Cambridge, UK
pDNEK	ETH-2 Antikörperbibliothek, Viti <i>et al.</i> , 2000
pGIIMH35S	Hust, 2002

### 2.1.6 Antikörpergenbibliotheken

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierten Antikörperfragmente entstammten zwei verschiedenen Antikörpergenbibliotheken. Dabei handelte es sich zum einen um die humane synthetische  $V_H + V_L$  scFv Bank Griffin.1 (MRC Center of Protein Engineering, Cambridge, UK) sowie um die ETH-2 Antikörpergenbibliothek (Viti *et al.*, 2000). Die Griffin.1 Bank besteht aus  $1,2 \times 10^9$  unabhängigen Klonen (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/~phage/>) und wurde durch Subklonierung der variablen Regionen der schweren und leichten Ketten aus den „lox library“ Vektoren (Griffith *et al.*, 1994) in den Phagemid Vektor pHEN2 (Abb. 2.1) erstellt.



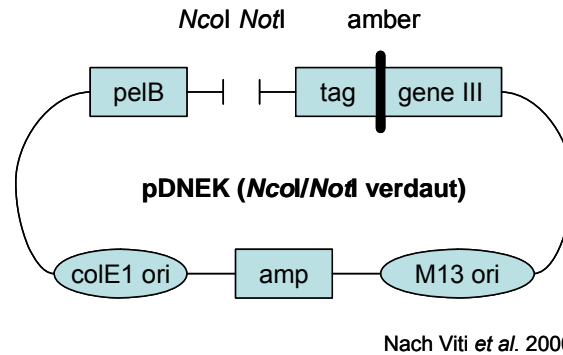
Quelle: <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/~phage/g1p.html>

**Abb. 2.1 Struktur des pHEN2 Phagemids.** Das zwischen der *NcoI* und der *NotI* Schnittstelle klonierbare scFv Gen wird am N-Terminus von einer Signalsequenz (*pelB*), am C-Terminus von Markierungen (*His*, *Myc*) flankiert. Der Signalsequenz vorgeschaltet sind ein LacZ Promotor (*Plac*) sowie eine Ribosomenbindestelle (*RBS*). Die Markierungssequenzen (*His*, *Myc*) sind durch ein *amber*-Stoppcodon vom Phagenhüllprotein III kodierenden Gen (*Gene III*) getrennt, was die Expression des scFvs als lösliches Protein oder als Fusionsprotein mit dem Hüllprotein III ermöglicht. Des Weiteren sind Replikationsursprünge für *E.coli* (*colE1 ori*) und den Phagen M13 (*M13 ori*) sowie ein selektierbares Markergen (*amp*) vorhanden.

Es handelt sich um eine semisynthetische scFv-Genbibliothek, deren  $V_H$ - und  $V_L$ -Ketten-Gene zur Erzeugung der Diversität partiell mit Zufallssequenzen versehen wurden (Griffith *et al.*, 1994). Bei den zugrunde liegenden Genen handelt es sich um 49 humane klonierte  $V_H$  Segmente (Nissim *et al.*, 1994; Tomlinson *et al.*, 1992), 26 humane klonierte  $V_k$  Segmente (Cox *et al.*, 1994)

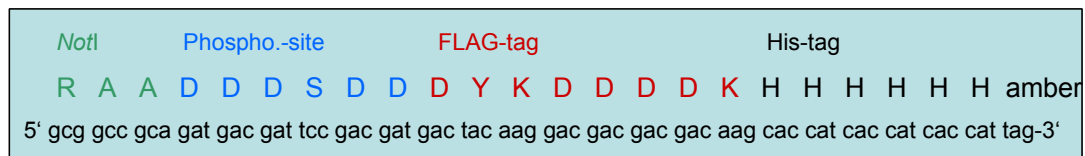
und 21 humane klonierte  $V_{\lambda}$  Segmente (Williams und Winter, 1993). Die V-Gene entstammen peripheren Lymphozyten nicht-immunisierter, gesunder Spender (Tomlinson *et al.*, 1992; Marks *et al.*, 1991). Somit stellt das V-Gen Repertoire der Griffin.1 Bank ein natives Repertoire dar. Der Phagemid Vektor pHEN2 (Abb. 2.1) enthält neben dem induzierbaren lacZ Promotor eine pelB Signalsequenz, welche die Sekretion der Antikörperfragmente in den periplasmatischen Raum des Wirtsbakteriums ermöglicht. Am 3' Ende des scFv-Gens befinden sich Sequenzen für eine 6x His- und eine c-Myc-Markierung, welche die Aufreinigung und Detektion der Antikörperfragmente ermöglichen. Das sich anschließende *amber*-Stopcodon ermöglicht die Expression der Antikörperfragmente in löslicher Form, oder durch „Überlesen“ des *amber*-Stopcodons in einem *E. coli* Suppressor-Stamm, als Fusionsprotein mit dem Phagenhüllprotein pIII. In Anwesenheit eines Helferphagen werden scFv-Phagen gebildet.

Auch bei der ETH-2 Antikörpergenbibliothek (Viti *et al.* 2000) handelt es sich um eine humane, semisynthetische Bibliothek im „single chain“ Fragment Format. Das V-Gen-Repertoire dieser Bank basiert bezüglich der schweren Kette lediglich auf dem Keimbahnsegment DP-47 (Tomlinson *et al.* 1992), bezüglich der leichten Ketten auf den Segmenten DPK-22 und DPL-16 (Marks *et al.* 1991 und Cox *et al.* 1994). Durch Randomisierung der CDR3-Regionen der jeweiligen Segmente mittels PCR, erhielt die Bank eine Diversität von mindestens  $5 \times 10^8$  unabhängigen Klonen. Die scFv-Gene wurden über *NotI* und *NcoI* Restriktionsschnittstellen in den Phagemid-Vektor pDNEK (Abb. 2.2) kloniert.



**Abb. 2.2 Struktur des pDNEK Phagemids.** Das zwischen der *NcoI* und der *NotI* Schnittstelle klonierbare scFv Gen wird am N-Terminus von einer Signalsequenz (pelB), am C-Terminus von Markierungen (tag) flankiert. Letztere sind durch ein *amber*-Stoppcodon vom Phagenhüllprotein III kodierenden Gen (gene III) getrennt, was die Expression des scFvs als lösliches Protein oder als Fusionsprotein mit dem Hüllprotein III ermöglicht. Des Weiteren sind Replikationsursprünge für *E.coli* (ColE1 ori) und den Phagen M13 (M13 ori) sowie ein selektierbares Markergen (amp) vorhanden.

Dabei handelt es sich um ein Derivat des Phagemids pDN322 (Pini *et al.*, 1998). Auch hier steht die Expression der scFvs unter der Kontrolle eines lacZ Promotors. Wie in pHEN2 ist eine pelB Signalsequenz und ein *amber* Stoppcodon vorhanden. Am 3' Ende der scFv Sequenz liegen die codierenden Sequenzen für eine Phosphorylierungsstelle sowie für eine FLAG- (Einhauer und Jungbauer, 2001) und eine 6x His-Markierung (Abb. 2.3), welche die Aufreinigung und Detektion der Antikörperfragmente ermöglichen.



**Abb. 2.3 C-Terminus eines scFv-Fragmentes der ETH-2 Bank.** Dargestellt sind eine *NotI* Restriktionsschnittstelle (*NotI*), eine Phosphorylierungsstelle (Phospho.-site) sowie Markierungssequenzen (FLAG-tag, 6x His-tag) jeweils in ihrer Aminosäure- („one letter code“) und Nukleotidsequenz.

### 2.1.7 Helferphagen

Als Helferphage zur Produktion von Phagenpartikeln wurde der „Hyperphage“ (Rondot *et al.*, 2001) der Firma PROGEN (Heidelberg) sowie der VCS M13 Phage der Firma Stratagene (La Jolla, CA, USA) verwendet.

### 2.1.8 Antikörper

Tab. 2.4 Für Immunfärbungen verwendete Antikörper

Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung
ANTI-FLAG® M2 Monoclonal Antibody	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:2000
His Tag (27E8) Monoclonal Antibody	NEB, Frankfurt	1:2000
Myc Tag (9B11) Mouse mAb	NEB, Frankfurt	1:2000
Goat Anti-Mouse IgG (whole molecule) Alkaline Phosphatase Conjugate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:5000

### 2.1.9 Oligonukleotide

Tab. 2.5 Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck ("Annealing"-Stelle)
50 fdSeq	gaa ttt tct gta tga gg	Sequenzierung (5' des gIII)
51 LMB3	cag gaa aca gct atg ac	Sequenzierung (vor pelB)
192 T7 Promotor	aat acg act cac tat agg g	Sequenzierung (T7 Promotor)
193 T7 Terminator	gct agt tat tgc tca gcg g	Sequenzierung (T7 Terminator)
270 LMB3MH_f2	cag gaa aca gct atg acc atg att acg cc	Amplifikation des scFv aus dem Vektor (vor pelB)
271 fdSeqMH_r2	gaa ttt tct gta tga ggt ttt gc	Amplifikation des scFv aus dem Vektor (5' des gIII)
297 MHGreen_f1	gtt ggg taa cgc cag gg	Kontrolle Klonierung in pGreen
298 MHTerminator_r1	ccc tta tct ggg aac tac tc	Kontrolle Klonierung in pGreen
360 IOHEN_r2	gga agc ttt gcg gcc gca cct agg acg g	Amplifikation des scFv aus dem Vektor (5' des gIII)
pSoup for	ccg tct atg gcc ctg caa ac	Nachweis von pSoup
pSoup rev	cct gtg gac agc ccc tca aa	Nachweis von pSoup
Npt I for 400	gaa aaa ctc atc gag cat ca	Nachweis <i>npt</i> I Gen in pGreen

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck ("Annealing"-Stelle)
Npt I rev 400	tgg tcc ttt taa cag cga tc	Nachweis <i>npt</i> I Gen in pGreen
iPCR pGII for	ggg aga ggc ggt ttg cgt at	Nachweis von "backbone junctions"
iPCR pGII rev	gcg cgc ggt gtc atc tat gt	Nachweis von "backbone junctions"

### 2.1.10 Molekulargewichtsmarker

#### DNA-Marker:

Die verwendeten DNA-Marker wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Dabei handelte es sich zum einen um die „O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus“ mit den Fragmentgrößen: 100-900, 1031, 1200, 1500, 2000 und 3000 bp. Zum anderen wurde die „O'Ruler™ 1 kb DNA-Ladder“ mit den Fragmentgrößen: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000-6000, 8000 und 10000 bp verwendet.

#### Proteinmarker:

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Proteinmarker verwendet. Dabei handelte es sich zum einen um das „Molecular Weight Marker Kit For Molecular Weight Range 14000 – 70000“ der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen). Dieser Marker setzt sich aus den Proteinen Bovine Serumalbumin (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), GAPDH (36 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Trypsinogen (24 kDa), Trypsin Inhibitor (20 kDa),  $\alpha$ -Lactalbumin (14,2 kDa) zusammen. Des Weiteren wurde der „Standard MWG Low Range“ der Firma Biorad (München) verwendet, der sich aus den Proteinen Phosphorylase b (97,4 kDa), Serumalbumin (66,2 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (31 kDa) und Lysozym (14,4 kDa) zusammensetzt. Darüber hinaus wurde der „Protein Molecular Weight Marker“ der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) eingesetzt. Dieser besteht aus den Proteinen  $\beta$ -Galaktosidase (116 kDa), Bovine Serumalbumin (66,2 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Lactat Dehydrogenase (35 kDa), REase Bsp98I (25 kDa),  $\beta$ -Lactoglobulin (18,4 kDa), Lysozyme (14,4 kDa)

### 2.1.11 Verwendete Kits

Folgende Kits wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

„GFX™ PCR, DNA and Gel Band Purification Kit“ (Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK),

„Nucleo-Spin® Extract II“ Kit (Macherey-Nagel, Düren)

und

„Thiol Coupling Kit“ (Biacore AB, Uppsala, Schweden)

### 2.1.12 Sulfonamide

Die Sulfonamide Sulfanilamid (SA) und Sulfamethoxypyridazin (SMP) wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

### 2.1.13 „Magnetic beads“

Die „magnetic beads“ SiMAG CI und SiMAG TCI wurden von der Firma Chemicell (Berlin) zur Verfügung gestellt. SiMAG CI tragen an der Silikaoberfläche C6-Linker mit endständiger reaktiver Chloromethylgruppe. Der C8-Linker der SiMAG TCI beads trägt hingegen endständig reaktive Carboxylgruppen (Abb. 2.4). Beide ermöglichen nach Aktivierung der reaktiven Gruppen mit einem Carbodiimid (EDC oder CMC) eine Immobilisierung von primären Aminen nach dem Prinzip von nukleophilen Substitutionsreaktionen.

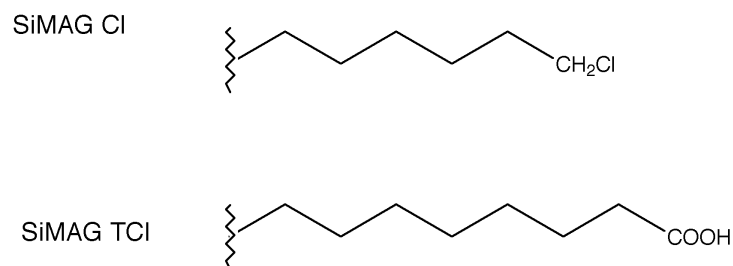
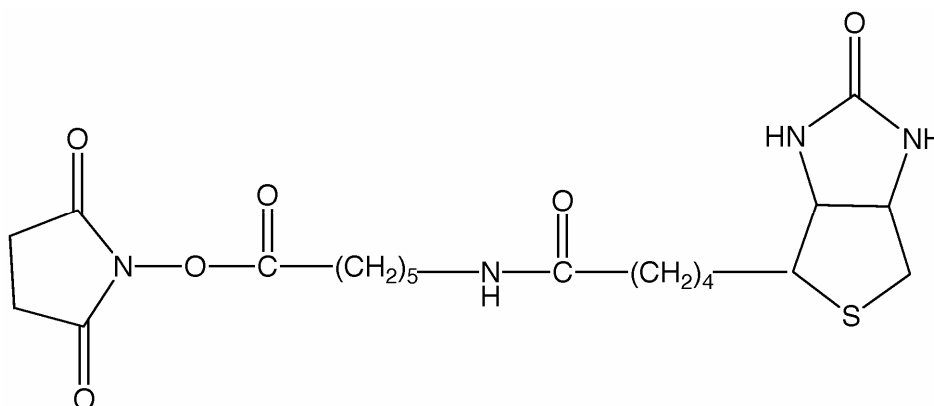


Abb. 2.4 Molekülstruktur der Linker Moleküle von SiMAG CI bzw. SiMAG TCI beads

### 2.1.14 Biotin-Linker Moleküle

Biotin ist ein kleines (244 Da) natürlich vorkommendes Vitamin das mit sehr hoher Affinität an Avidin bzw. Streptavidin bindet. N-Hydroxysuccinimid (NHS) Ester des Biotins reagieren in neutralem bis alkalischem pH Bereich (pH 7-9) sehr effizient mit primären Aminogruppen und bilden stabile Amid-Bindungen aus, wobei N-Hydroxysuccinimide als Abgangsgruppe fungiert. Im Rahmen der

vorliegenden Arbeit wurde daher EZ-Link<sup>®</sup> NHS-LC-Biotin (Abb. 2.5) der Firma Pierce (Perbio Science, Bonn) zur Kopplung von Molekülen mit primären Aminogruppen verwendet.

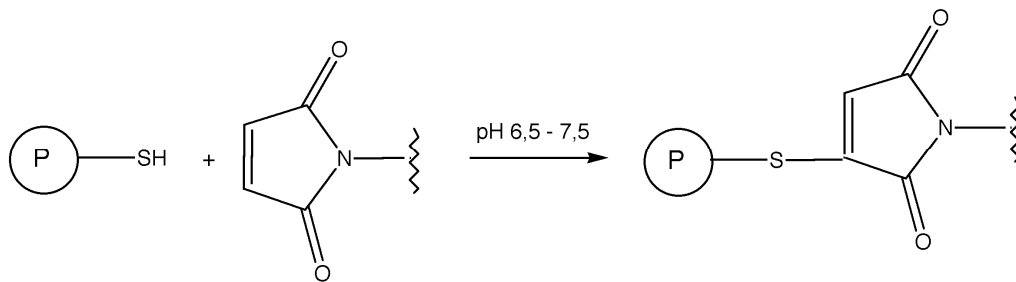


**Abb. 2.5 Molekülstruktur von EZ-Link<sup>®</sup> NHS-LC-Biotin.** Das dargestellte Molekül weist ein Molekulargewicht von 455,5 g/mol auf. Das synthetische C11 Linkermolekül, das die N-Hydroxysuccinimid- und die Biotin-Gruppe miteinander verbindet, hat eine Länge von 22,4 Å.

Die so hergestellten Biotin-Konjugate konnten an Streptavidin-gekoppelte Mikrotiterplatten immobilisiert werden.

#### 2.1.15 Thiol-Linker Moleküle

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Thiol-Linker Konjugate zur Immobilisierung von Sulfamethoxypyridazin eingesetzt. Das erste (SMP-Thiol) wurde freundlicherweise durch Dr. Holger Ottleben und Dr. Kristina Schmidt von der Firma Graffinity Pharmaceutical Design (Business Unit der Santhera AG) (Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Ein zweites Konjugat wurde per Auftragssynthese durch die Firma Kadem Custom Chem (KDMCC, Göttingen) hergestellt. In einem Fall handelt es sich um ein C9- (SMP-VBlink, KDMCC) im anderen Fall um ein C12-Linker Molekül (SMP-Thiol, Graffinity) jeweils mit terminaler Thiol-Gruppe. Das Sulfamethoxypyridazin wurde über die benzenringständige primäre Aminogruppe (Graffinity, Dickopf *et al.* 2004) bzw. die pyridazinringständige Methoxygruppe (KDMCC) konjugiert. Die terminale SH-Gruppe des Linker Konjugats ermöglicht in pH Bereichen von 6,5 bis 7,5 die Immobilisierung an Maleimid-aktivierte Mikrotiterplatten nach folgendem Reaktionsprinzip (Abb. 2.6).



**Abb. 2.6 Immobilisierung an Maleimid-aktivierte Mikrotiterplatten.** Dargestellt ist ein typischer Kopplungsmechanismus basierend auf der Maleimid-Chemie für Sulfhydryl (-SH) Gruppen. Der hier für Proteine (P) gezeigte Mechanismus gilt in gleicher Weise für SH-Gruppen tragende niedermolekulare Liganden.

### 2.1.16 Material für Biacore-Analysen

Für Affinitätsmessungen mittels Oberflächenplasmonresonanz wurde eine Biacore 3000-Anlage der Firma Biacore AB (Uppsala, Schweden) eingesetzt. Alle benötigten Sensor-Chips (Sensor Chip SA und CM5) sowie Puffer (HBS-EP Puffer) wurden von der gleichen Firma bezogen.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Anzucht von Bakterien

Die Anzucht von Bakterien erfolgte in LB-Medium pH 7,0, 2 x TY-Medium pH 7,5, TB-Medium oder bei der Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens* in YEP-Medium pH 7,0 unter Selektion mit den jeweiligen Antibiotika (Tab. 2.2 und 2.3). Flüssigkulturen wurden immer ausgehend von Einzelkolonien bzw. Glycerinstocks angeimpft und ihre Anzucht erfolgte bei 37 °C bzw. 28 °C (*A. tumefaciens*) und 150 bis 220 Upm.

### 2.2.2 Bestimmung der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) einer Bakterienkultur

Die optische Dichte (OD<sub>600</sub>) von Bakterienkulturen wurde bei 600 nm in einem Spektralphotometer (Ultrospec 3000 UV/visible Spektrophotometer, Amersham Pharmacia Biotech) bestimmt.

### 2.2.3 Anlegen von Glycerinstocks

Für die langfristige Lagerung von Bakterienkulturen bei -80 °C wurden Glycerinstocks angelegt. Dazu wurden einem Aliquot der Kultur final 13 bis 15 % (v/v) steriles Glycerin zugegeben. Anschließend wurde sorgfältig gemischt und die Kultur in flüssigem Stickstoff schockgefroren.



#### 2.2.4 Isolation von Plasmiden aus Bakterienkulturen

Die Isolation von Plasmiden aus Bakterienkulturen wurde basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Sambrock *et al.* (1989) durchgeführt. Die DNA-Konzentration der Proben wurde photometrisch bestimmt (2.2.5) und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgte photometrisch über Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm in einem Spektralphotometer (Ultrospec 3000 UV/visible Spektrophotometer, Amersham Pharmacia Biotech). Die DNA-Konzentration berechnete sich daraus wie folgt:

$$\mu\text{g DNA/ml} = \text{OD}_{600} \times 50$$

Aus dem Quotienten  $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$  ließen sich Rückschlüsse über die Reinheit der DNA-Lösungen ziehen. Der Quotient einer reinen DNA-Lösung beträgt 1,8.

#### 2.2.6 Herstellung Hitzeschock-kompetenter *E. coli* Zellen

Kompetente *E. coli* Zellen wurden mit Modifikationen nach Nakata *et al.* (1997) und Tang *et al.* (1994) hergestellt.

#### 2.2.7 Herstellung elektrokompeter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung elektrokompeter *E. coli* oder *A. tumefaciens* Zellen wurde eine 100 ml Übernachtkultur des jeweiligen Stammes in zwei 50 ml Reaktionsgefäßen für 5 min bei 4 °C und 3000 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden in je 10 ml sterilem, eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und es wurde erneut wie oben angegeben zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Pellets in je 5 ml sterilem, eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen, aliquotiert und in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

#### 2.2.8 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen durch Hitzeschock

Die Transformation kompetenter Bakterien durch Hitzeschock erfolgte mit Modifikationen nach Nakata *et al.* (1997) und Tang *et al.* (1994).

### 2.2.9 Transformation kompetenter Bakterien durch Elektroporation

Für die Transformation elektrokompetenter *E. coli* oder *A. tumefaciens* Zellen wurden in einer vorgekühlten Elektroporations-Küvette (Gene Pulser® Cuvette, BioRad Hercules, CA, USA) 50 µl kompetente Zellen zu 50 ng Plasmid-DNA gegeben und auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω. Der Puls hatte eine Feldstärke von 6,25 bis 12 kV/cm und die T2 betrug 4 bis 8 ms. Sofort nach der Elektroporation wurden 500 µl vorgekühltes SOC-Medium zugegeben und es wurde 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz bei *E. coli* für 1,5 h bei 37 °C, bei *A. tumefaciens* für 3 h bei 28 °C und 220 Upm regeneriert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (1 min, 10000 x g, RT) pelletiert, in 100 µl SOC-Medium aufgenommen und auf LB- bzw. YEP-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. *E. coli* Zellen wurden über Nacht bei 37 °C, *A. tumefaciens* 24 bis 48 h bei 28 °C inkubiert.

### 2.2.10 *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation von *Nicotiana tabacum*

*Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 wurden mittels Elektroporation mit den gewünschten Konstrukten transformiert (2.2.9). Nach Kontrolle der Transformanden wurden Kulturen der gewünschten Stämme in YEP-Medium angeimpft und ÜN bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,9 kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen 1:10 in MS 0-Medium (0,44 % (w/v) MS+vit, 3 % (w/v) Saccharose; pH 5,7) verdünnt. Die *N. tabacum* Blätter wurden in 1 cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten, verletzt und in MS 0-Medium gesammelt (mind. 20 Explantate pro Kontrolle und mind. 100 Explantate pro Klon). Anschließend wurden sie für 15 min in der verdünnten Bakteriensuspension des jeweiligen Klons geschwenkt, bevor sie auf Co-Kulturmedium (0,44 % (w/v) MS+vit, 3 % (w/v) Saccharose; pH 5,8 mit 0,3 % (w/v) Gelrite, 0,456 µg/ml Zeatin und 0,1 µM Acetosyringon) ausgelegt und für 2 Tage im Dunkeln bei 24 °C inkubiert wurden. Im Anschluss wurden die Explantate dreimal in sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und auf MSZ-Medium<sup>+Tic +Com</sup> überführt (0,44 % (w/v) MS+vit, 3 % (w/v) Saccharose; pH 5,8 mit 0,8 % (w/v) Plant Agar, 0,456 µg/ml Zeatin, 100 µg/ml Ticarcillin und 25 µg/ml Combactam). Die weitere Selektion erfolgte durch Umsetzen der Explantate nach dem in Tab. 2.7 aufgeführten Schema.

Die Kultivierung der Explantate erfolgte bei 24 °C und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8h. Die Selektion auf transformierte Zellen erfolgte, basierend auf dem Markergen *bar*, unter Zugabe steigender Konzentrationen an Phosphinotricin (PPT).

**Tab. 2.6 Kultivierung und Selektion der *N. tabacum* Transformanden**

Tag nach Transformation	<i>npt I</i> Gen Selektion (µg/ml)	Antibiotika	Hormone	Medium
11.	3 PPT	Tic, Com	Zeatin	MSZ (Platten)
24.	3 PPT	Tic, Com	Zeatin	MSZ (Becher)
58.	5 PPT	Tic, Com	Zeatin	MSZ (Becher)
101.	10 PPT	Tic, Com	-	MSZ (Becher)
123.	10 PPT	Tic, Com	-	MSZ (Becher)
133.	10 PPT	Tic, Com	-	MSZ (Becher)

Im Folgenden wurden die primären Regenerate alle 4 bis 6 Wochen auf dem zuletzt aufgeführten Medium umgesetzt.

### **2.2.11 Isolation genomischer DNA aus *N. tabacum***

Zur Isolation genomischer DNA aus transformierten *N. tabacum* Pflanzen, wurden ca. 200 mg Blattmaterial unter flüssigem Stickstoff homogenisiert und anschließend in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Es folgte die Zugabe von 800 µl auf 65 °C vorgewärmten CTAB-Puffer (3 % (w/v) CTAB, 1,4 M NaCl, 0,2 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 0,5 % (w/v) PVP, 100 mM Tris HCl pH 8,0) und eine 20 minütige Inkubation bei 65 °C. Nach der Zugabe von 800 µl frisch angesetztem Cl-Mix (Chloroform/Isoamylalkohol 24:1) wurde für 10 min bei 12000 Upm und RT zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415 C). Die wässrige Phase wurde abgenommen und durch Zugabe von 2/3 Volumen eiskaltem Isopropanol gefällt. Anschließend wurde wie oben angegeben zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Waschpuffer (76 % (v/v) Ethanol, 10 mM Ammoniumacetat) gewaschen und dann in 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen. RNaseA wurde bis zu einer finalen Konzentration von 10 µg/ml zugegeben und es wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von 100 µl 7,5 M

Ammoniumacetat und 750 µl 96 % (v/v) Ethanol gefällt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (s.o.). Das Pellet wurde im Anschluss in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Lagerung der so isolierten DNA erfolgte bei -20 °C.

### 2.2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Abschnitten erfolgte mit Hilfe der „Polymerase Chain Reaction“ (PCR) nach Mullis *et al.* (1986). Als Polymerase wurde die Taq DNA Polymerase der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) oder die BioThermRed™ Taq DNA-Polymerase (Genecraft, Lüdinghausen) verwendet. Es wurden jeweils 1,5-2,5 Einheiten der Polymerasen pro PCR-Reaktion eingesetzt. Alle Primer wurden in Konzentrationen von 10 bis 100 pM verwendet. Die PCRs wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen in einem Thermocycler (TRIO-Thermoblock™, Biometra, Göttingen oder T3 Thermocycler, Biometra Göttingen) durchgeführt.

Folgendes Amplifikationsprotokoll wurde häufig verwendet:

94 °C	1 min	} 30 Zyklen
94 °C	1 min	
X °C	1 min	
72 °C	1 min	
94 °C	1 min	
X °C	1 min	
72 °C	10 min	
4 °C	Pause	

Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.17) überprüft.

### 2.2.13 Kolonie-PCR

Die Analyse bakterieller Klone aus Transformationen (2.2.8) oder aus Selektionen auf Vollständigkeit der Inserts erfolgte mittels Kolonie-PCR. Diese wurde wie bei Lauer (2005) beschrieben durchgeführt.

### 2.2.14 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Plasmiden wurde in 25 µl Ansätzen für 2 bis 18 h bei 37 °C durchgeführt und erfolgte ansonsten wie bei Hust (2002) beschrieben.

### **2.2.15 Dephosphorylierung geschnittener DNA**

Für 5'-Dephosphorylierungen restriktionsverdauter DNA wurde die „Shrimp Alkaline Phosphatase (1 unit/ $\mu$ l)“ der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Die Reaktionen wurden in 25  $\mu$ l Ansätzen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **2.2.16 Ligation**

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Ligationen erfolgten mit einem Vektor:Insert-Verhältnis von 1:10. Als DNA-Ligase wurde die „T4-DNA-Ligase (5 Weiss units/ $\mu$ l)“ der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) im entsprechenden Puffersystem verwendet. Pro 20  $\mu$ l Ligationsansatz wurden 2,5 Weiss Einheiten der T4-DNA-Ligase eingesetzt. Die Ligationen erfolgten für 2 h bei 22 °C und anschließend über Nacht bei 4 °C im TRIO-Thermoblock™ der Firma Biometra (Göttingen).

### **2.2.17 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Kontrolle von PCR-, Kolonie-PCR- und Restriktionsfragmenten erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese in 1 % (w/v) Agarose-Gelen. Diese wurde wie bei Lauer (2005) beschrieben durchgeführt.

### **2.2.18 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das „GFX™ PCR, DNA and Gel Band Purification Kit“ (Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, England) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### **2.2.19 Aufreinigung von PCR-Ansätzen**

Die Aufreinigung von PCR-Ansätzen erfolgte mithilfe des „Nucleo-Spin® Extract II“ Kits (Macherey-Nagel, Düren) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **2.2.20 Sequenzierung**

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten wurde von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) durchgeführt.

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Expression löslicher scFv-Antikörper

Die Expression löslicher scFv-Antikörper in Bakterien erfolgte mithilfe des Expressionsvektors pET 20b(+) (Novagen) bzw. direkt mit dem Phagemid-Vektor pDNEK (Viti *et al.* 2000). Als bakterielle Expressionssysteme wurden die *E. coli* Stämme BLR (DE3), BLR (DE3) pLysS und TB1 verwendet. Alle Arbeiten mit dem Expressionsstamm *E. coli* TB1 wurden in TB-Medium ausgeführt, für alle übrigen Stämme wurde 2 x TY-Medium verwendet. Allen Medien wurde Ampicillin in einer finalen Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Die Expressionskulturen wurden im jeweils benötigten Volumen in Schikanekolben aus Übernachtskulturen 1:500 verdünnt angeimpft. Bei den Arbeiten mit pDNEK wurde den Übernachtskulturen zusätzlich 1 % (w/v), den Expressionskulturen 0,1 % (w/v) Glukose zugefügt. Die Anzucht der Expressionskulturen erfolgte bei 37 °C und 150 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 (BLR-Stämme) bzw. 0,8 (TB1). Der *lacZ*-Promotor oder indirekt der T7-Promotor wurde mit final 0,5 mM IPTG induziert. Die weitere Induktion erfolgte im Schüttelinkubator bei 150 Upm für 16 bis 20 Stunden und je nach Versuch bei Raumtemperatur oder 30 °C.

### 2.3.2 Isolation löslicher scFv-Antikörper aus dem Kulturüberstand oder der periplasmatischen Fraktion von *E. coli*

Die löslichen scFv-Antikörper wurden entweder direkt aus dem Kulturüberstand von Expressionskulturen (2.3.1) oder über die Präparation der periplasmatischen Proteinfraktion von *E. coli* isoliert. Für die Isolation aus dem Kulturüberstand wurden 200 ml Expressionskultur für 15 min bei 10800 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde abgenommen und mit Tris-Base auf pH 8,0 eingestellt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung über Protein A-Affinitätschromatographie (2.3.5). Für die Isolation löslicher scFvs aus der periplasmatischen Proteinfraktion von *E. coli* wurden 500 ml Expressionskultur für 10 min bei 4400 x g und 4 °C abzentrifugiert. Jedes Pellet wurde in 25 ml eiskaltem PE-Puffer aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert, wobei in 5 min Abständen kurz gevortext wurde. Anschließend wurde für 30 min bei 30000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände enthielten die

periplasmatische Proteinfraction (PPP) aus *E. coli*. Für den osmotischen Schock wurden die Pellets in je 25 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O resuspendiert, und es wurde wie oben beschrieben auf Eis inkubiert. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 30 min bei 30000 x g und 4 °C. Die Überstände enthielten die Osmotische Schock Präparation (OSP). PPP und OSP enthielten etwa zu gleichen Teilen den löslichen scFv. Sie wurden getrennt oder vereinigt je nach Versuch über Ni-NTA IMAC (2.3.4) oder Protein A-Affinitätschromatographie (2.3.5) aufgereinigt.

### **2.3.3 Native Proteinisolation aus Pflanzen (*N. tabacum*)**

Um aus transformierten Tabakpflanzen rekombinanten scFv für nachfolgende Bindungsanalysen zu isolieren, wurde eine native Proteinisolation durchgeführt. Dazu wurden 2 bis 3 g Blattmaterial mit entfernter Mittelrippe unter flüssigem Stickstoff in einem vorgekühlten sterilen Mörser gründlich homogenisiert. Nach Zugabe der doppelten bis dreifachen Menge Proteinextraktionspuffer (200 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 0,1 % (v/v) Tween 20, 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O) und gründlichem Mischen wurde die Probe zwei mal für 10 min bei 15000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der so entstandene homogene Pflanzenextrakt wurde über Ni-NTA IMAC aufgereinigt (2.3.4).

### **2.3.4 Aufreinigung von His-markiertem scFv über Ni-NTA IMAC**

Die Aufreinigung von His-markierten scFvs, die aus der Griffin.1 Bank (2.1.6) hervorgingen, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit über Ni-NTA IMAC. Diese wurde als Durchfluss-Chromatographie unter Verwendung von His-Bind-Quick Säulen (Novagen) durchgeführt. Die gesamte Aufreinigung erfolgte bei 4 °C. Die Säulen wurden zunächst mit 7,5 ml Bindungspuffer (5 mM Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,9) äquilibriert, wonach der aufzureinigende Proteinextrakt aufgetragen wurde. Es wurde nachfolgend mit 25 ml Bindungspuffer und 15 ml Waschpuffer (60 mM Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,9) gewaschen, bevor mit 15 ml Elutionspuffer (1 M Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,9) eluiert wurde. Die Eluate wurden anschließend aufkonzentriert und umgepuffert (2.3.6). Die Reinheit der Eluate wurde über SDS-PAGE (2.3.8) und anschließende Coomassie- oder

Silberfärbung (2.3.9 und 2.3.10) bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (2.3.7) und die scFvs wurden bei -20 °C gelagert.

### **2.3.5 Aufreinigung von rekombinantem scFv über Protein A-Affinitätschromatographie**

Alle scFv-Klone, die aus der ETH-2 Bank (2.1.6) hervorgingen enthalten ein V<sub>H</sub> DP-47 Keimbahn-Segment aus der humanen V<sub>H</sub>3 Familie und konnten daher über Protein A-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden (Hoogenboom *et al.*, 1992). Als Matrix wurde die „r-Protein A-Sepharose™ 4 Fast Flow Matrix“ (r-PRA36-4FF) der Firma Affiland (Lüttich, Belgien) sowie Protein A-Agarose der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Beide Materialien wurden für die Aufreinigung in einem Volumen von 1 ml in Einweg-Säulchen (2,5 ml, Terumo, Leuven, Belgien) gepackt. Für die r-Protein A-Sepharose™ 4FF entspricht das einer Bindungskapazität von etwa 20 mg IgG für die Protein A-Agarose einer Bindungskapazität von 10 bis 20 mg IgG. Die gesamte Aufreinigung wurde bei 4 °C durchgeführt. Dazu wurde die Säule zunächst mit 10 ml 50 % (v/v) Ethanol und anschließend mit 50 ml sterilem PBS gewaschen. Dann wurde sie mit dem 10 x Säulenvolumen (10 ml) 20 mM Tris HCl pH 8,0 äquilibriert. Der aufzureinigende Proteinextrakt (periplasmatische Fraktion, Kulturüberstand) wurde mit Tris-Base auf pH 8,0 eingestellt und über die Säule gegeben. Anschließend wurde nachfolgend mit dem 6 x Säulenvolumen 20 mM Tris HCl pH 8,0 und dem 10 x Säulenvolumen 20 mM Glycin HCl pH 5,0 gewaschen. Für die Elution wurden zunächst in fünf bis sieben 1,5 ml Reaktionsgefäßen jeweils 100 µl 1 M Tris HCl pH 8,0 vorgelegt. Die Elution erfolgte dann mit dem 3 bis 5 x Säulenvolumen 0,1 M Glycin HCl pH 2,5. Die Eluate wurden in 1 ml Fraktionen in den vorbereiteten Reaktionsgefäßen aufgefangen und so direkt neutralisiert. Die Regeneration der Säule erfolgte anschließend mit dem 10 x Säulenvolumen 0,1 M Na-Acetat/0,5 M NaCl und sie wurde in 1 x PBS mit 0,02 % NaN<sub>3</sub> gelagert. Die Reinheit der Eluate wurde über SDS-PAGE (2.3.8) und anschließende Silberfärbung (2.3.10) bestimmt. Die scFv enthaltenden Eluate wurden vereinigt, aufkonzentriert und umgepuffert (2.3.6). Anschließend wurde die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt (2.3.7). Die Lagerung der so aufgereinigten scFvs erfolgte bei -20 °C.



### 2.3.6 Einengen und Umpuffern von aufgereinigten scFv-Proben

Nach Aufreinigung der scFvs (2.3.4 und 2.3.5) wurden die Eluate aufkonzentriert und in HBS-EP-Puffer (HBS-EP Buffer filtered, degassed, 0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005 % (v/v) Surfactant P20; Biacore AB, Uppsala, Schweden) für Bindungsanalysen an der Biacore 3000 umgepuffert. Dieses erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von „Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices 10.000 MWCO“ (Millipore Corporation, Bedford MA, USA). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für die Umpufferung wurde mindestens fünfmal mit 15 ml HBS-EP Puffer gewaschen.

### 2.3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der aufgereinigten scFvs wurde im Rahmen dieser Arbeit mit einem Ultrospec 3000 UV/visible Spektrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech) bestimmt. Dazu wurde die Absorption der scFv Proben in einer 1 : 10 Verdünnung bei 280 nm gemessen. Eine Absorptionseinheit bei einer Extinktion von 1 entspricht 0,7 µg/ml scFv (Affiland, Lüttich, Belgien).

### 2.3.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde mit Modifikationen nach Hust (2002) durchgeführt.

### 2.3.9 Coomassiefärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Auch die Coomassiefärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte mit Modifikationen nach Hust (2002).

### 2.3.10 Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen wurde nach Blum *et al.* (1987) durchgeführt. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung auf einer Wippe. Zunächst wurden die Proteine im Gel für mindestens eine Stunde oder über Nacht in 50 ml Stopplösung (50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Eisessig in H<sub>2</sub>O) mit 25 µl 37 % (v/v) Formaldehyd fixiert. Anschließend wurde das Gel dreimal für 20 min mit 50 % (v/v) Ethanol gewaschen. Es folgte eine 1 min Inkubation in Na-Thiosulfatlösung (10 mg Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5H<sub>2</sub>O in 50 ml H<sub>2</sub>O), worauf dreimal für 20 s

mit H<sub>2</sub>O gewaschen wurde. Anschließend wurde das Gel für 20 min in einer AgNO<sub>3</sub>-Lösung (0,5 ml 20 % (w/v) AgNO<sub>3</sub>, 37,5 µl 37 % (v/v) Formaldehyd in 50 ml H<sub>2</sub>O) inkubiert. Es wurde erneut zweimal für 20 s mit H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend für 1 bis 10 min in Entwickler-Lösung (1 ml Thiosulfatlsg., 3 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 25 µl 37 % (v/v) Formaldehyd in 50 ml H<sub>2</sub>O) die Färbung entwickelt. Bei Sichtbarwerden erster Protein-Banden wurde die Färbung durch zweimal 2 min Waschen mit H<sub>2</sub>O und 10 min Inkubation in der Stopplösung abgebrochen. Die kurzfristige Lagerung der so gefärbten Gele erfolgte in H<sub>2</sub>O.

### **2.3.11 Western Blot**

Der Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrocellulose-Membranen (PROTRAN<sup>®</sup> Nitrocellulose Transfer Membrane, Schleicher & Schuell, Dassel) erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit Modifikationen nach Hust (2002).

### **2.3.12 Ponceaufärbung und Blotabsättigung**

Die Färbung auf Nitrocellulosemembranen transferierter Proteine und die Blotabsättigung erfolgte wie bei Reinard *et al.* (1994) und Hust (2002) beschrieben.

### **2.3.13 Immunfärbungen**

Die Immunfärbungen wurden mit Modifikationen nach Hust (2002) durchgeführt. Die Antikörper wurden jeweils in 20 ml Blotto (mit 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub>) verdünnt eingesetzt.

## **2.4 Methoden zur Selektion von rekombinanten Antikörpern**

### **2.4.1 Exponentiell wachsende *E. coli* Kulturen für die Infektion mit scFv-Phagen**

Um eine effiziente F-Pili-Ausbildung F'-tragender *E. coli* Zellen für eine erfolgreiche Infektion mit scFv-Phagen zu gewährleisten, wurden betreffende Bakterienkulturen bei 37 °C und 220 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,32 bis 0,34 angezogen. Anschließend wurde die Umdrehungszahl auf 40 Upm reduziert und es wurde weiter bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,5 inkubiert. Mit einem

Aliquot dieser Kultur wurden dann die Phagen-Infektionen durchgeführt. XL-1 Zellen wurden zusätzlich vor Ihrer Anzucht auf M9-MM-Agarplatten ausgestrichen, um eine zusätzliche Selektion auf das F'-Episom zu erwirken.

#### **2.4.2 Phageninfektionen**

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Infektionen von Bakterienzellen mit scFv- oder Helferphagen erfolgten für 30 min bei 37 °C ohne Bewegung.

#### **2.4.3 Kopplung von Sulfamethoxypyridazin (SMP) an „magnetic beads“ (I)**

Für die direkte Immobilisierung von Sulfamethoxypyridazin (SMP) an „magnetic beads“ wurden SiMAG Cl beads (Lot 09/01) der Firma Chemicell (Berlin) verwendet. Die Kopplung erfolgte mit Modifikationen nach einem Protokoll des Herstellers. Dazu wurden 2 x 10 mg/ml SiMAG Cl zweimal mit je 1 ml w + c Puffer (0,1 M MES, pH 5,65) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die beads in je 0,5 ml 96 % (v/v) Ethanol aufgenommen und vereinigt. 10 mg CMC wurden zugegeben und es wurde 5 min unter Bewegung (Rotamix RM1; ELMI, Tartu, Estland) bei RT inkubiert. 0,5 ml des gelösten Liganden (6,6 mg/ml SMP in 96 % (v/v) Ethanol) wurden zugegeben und es wurde für 3 h unter Bewegung (s.o.) bei RT inkubiert. Die beads wurden anschließend zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen und nach dem letzten Waschschrift in 1 ml b + s Puffer (0,1 % (w/v) Glycin, 50 mM Tris-HCl pH 7,5) aufgenommen. Die Lagerung der SMP-gekoppelten beads erfolgte bei 4 °C.

#### **2.4.4 Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an „magnetic beads“ (I)**

Die Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an SMP-gekoppelten „magnetic beads“ wurde mit Modifikationen nach Griffith *et al.* (1993 und 1994) und Marks *et al.* (1991) durchgeführt. Pro Selektionsrunde wurden 500 µl der gekoppelten beads (2.4.3) mit  $1 \times 10^{12}$  scFv-Phagen der Griffin.1 Bank (2.1.6) gelöst in PBS eingesetzt. Es wurde für 2 h bei RT unter Bewegung (Rotamix RM1; ELMI, Tartu, Estland) inkubiert. Anschließend wurde nachfolgend 10 mal mit PBS-Tween pH 5,5, 10 mal mit PBS-Tween pH 7,4 und 5 mal mit PBS pH 7,4 gewaschen (je 1 ml). Die Elution gebundener scFv-Phagen erfolgte mit 1 ml 0,1 M Glycin HCl pH 2,2 für 15 min unter Bewegung bei RT. Anschließend

wurde mit 2 ml Phosphatpuffer (6 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , pH 7,4) neutralisiert. Vom Eluat und ausgewählten Fraktionen wurde der Phagentiter bestimmt (2.4.14). Mit den übrigen eluierten scFv-Phagen wurden 10 ml einer exponentiell wachsenden *E. coli* TG1 Kultur infiziert (2.4.1 und 2.4.2). Anschließend wurde für 10 min bei 4400 Upm und RT (Hereus Sepatech Megafuge 1.0 R) zentrifugiert und das Pellet in 50 ml 2 x TY mit 1 % (w/v) Glukose und 50 µg/ml Ampicillin aufgenommen. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37 °C angezogen und am nächsten Tag für die Amplifikation der scFv-Phagen verwendet (2.4.12). Die amplifizierten scFv-Phagen einer jeden Selektionsrunde wurden für die jeweils folgende Selektionsrunde eingesetzt.

#### **2.4.5 Kopplung von Sulfamethoxypyridazin (SMP) an „magnetic beads“ (II)**

Für die Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an „magnetic beads“ unter Verwendung der ETH-2 Bank (2.1.6) wurde ein im Vergleich zu 2.4.3 leicht modifiziertes Kopplungsprotokoll durchgeführt. Verwendet wurden SiMAG TCI beads (Lot 03/03) der Firma Chemicell (Berlin). Der w + c Puffer (0,1 M MES) hatte einen deutlich reduzierten pH-Wert von 4,0. Ansonsten entsprach die Durchführung der Immobilisierung der unter 2.4.3 beschriebenen.

#### **2.4.6 Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an „magnetic beads“ (II)**

Die Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an „magnetic beads“ unter Verwendung der ETH-2 Bank (2.1.6) erfolgte mit leichten Modifikationen wie unter 2.4.4 beschrieben. Pro Selektionsrunde wurden hier  $1 \times 10^9$  (100 µl) gekoppelte beads mit  $1 \times 10^{12}$  scFv-Phagen der ETH-2 Bank gelöst in PBS eingesetzt. Nach Inkubation der Phagen mit den beads wurde nachfolgend 10 mal mit PBS-Tween pH 5,0, 10 mal mit PBS-Tween pH 7,4 und 20 mal mit PBS pH 7,4 gewaschen. Eluiert wurde hier mit 0,5 ml 0,1 M Glycin HCl pH 2,2. Die Neutralisation erfolgte mit 1 M PBS. Der Phagentiter des Eluats sowie von ausgewählten Fraktionen wurde bestimmt (2.4.14). Anschließend wurden 10 ml einer exponentiell wachsenden *E. coli* TG1 Kultur (2.4.1) mit dem übrigen Eluat infiziert (2.4.2). Es wurde für 10 min bei 3300 x g und RT zentrifugiert und das Pellet wurde in 1 ml 2 x TY resuspendiert. Anschließend wurde es zu je 0,5 ml auf zwei  $\text{TYE}^{+\text{Amp}+\text{Glc}}$ -Platten (Ø 14 cm) ausplattiert und max. 14 h bei 37 °C inkubiert. Die so entstehenden Kolonien wurden für die Amplifikation der scFv-

Phagen (2.4.12) verwendet. Die amplifizierten scFv-Phagen einer jeden Selektionsrunde wurden für die jeweils folgende Selektionsrunde eingesetzt.

#### **2.4.7 Kopplung von Sulfanilamid (SA) und Sulfamethoxypyridazin (SMP) an ein Biotin-Linker Molekül**

Für eine indirekte Immobilisierungsstrategie der Moleküle Sulfamethoxypyridazin (SMP) und Sulfanilamid (SA) wurden Biotin-Linker Konjugate hergestellt. Die eigentliche Immobilisierung erfolgte dann an Streptavidin-gekoppelten Mikrotiterplatten. Als Trägermolekül wurde das EZ-Link<sup>®</sup> NHS-LC Biotin der Firma Pierce verwendet (2.1.14). Die Kopplung von SMP bzw. SA an EZ-Link<sup>®</sup> NHS-LC Biotin wurde mit Modifikationen nach einem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde 1 mg/ml des Biotin-Linkers in 100 % (v/v) DMSO gelöst. Die beiden Sulfonamide wurden jeweils im 10 x molaren Überschuss gelöst in 40 % (v/v) DMSO (in PBS pH 7,4) eingesetzt. Es wurden 1:1 Reaktionsgemische angesetzt, die für 2 h bei RT unter Bewegung (Rotamix RM1; ELMI, Tartu, Estland) inkubiert wurden. Der Erfolg der Kopplungen wurde massenspektrometrisch überprüft (2.5). Die Konjugate wurden anschließend bei 4 °C gelagert.

#### **2.4.8 Selektion SA- und SMP-spezifischer scFv-Phagen an Streptavidin-gekoppelten Mikrotiterplatten**

Für die Selektion SA- und SMP-spezifischer scFv-Phagen an Streptavidin-gekoppelten Mikrotiterplatten wurden „Nunc Streptavidin Plates C8“ der Firma Nunc (Wiesbaden) verwendet. Die Selektionen wurden mit Modifikationen nach Viti *et al.* (2000) durchgeführt. Vor jeder Selektionsrunde wurde eine Präselektion am unkonjugierten Biotin-Linker durchgeführt, um unspezifische scFv-Phagen weitgehend aus der Phagen-Population zu entfernen. Dazu wurden  $1 \times 10^{12}$  scFv-Phagen aus der ETH-2 Bank (2.1.6) in einer entsprechend beschichteten Vertiefung vorinkubiert. Für die Selektion wurden 100 µl des Kopplungs-gemisches in eine Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben und für 30 min bei 37 °C ohne Bewegung inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit je 200 µl PBS-Tween. Die Phagen aus der Präselektion wurden in die Selektions-Vertiefung überführt und wie oben beschrieben bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 15 mal mit PBS-Tween und 5 mal mit PBS

gewaschen (je 200 µl). Die Elution erfolgte mit 100 µl 0,1 M Glycin HCl pH 2,8 für 15 min, anschließend wurde sofort mit 100 µl 1 M PBS neutralisiert. Von den Eluaten und ausgewählten Fraktionen wurden Titerbestimmungen (2.4.14) durchgeführt. Die Re-Infektion einer XL1 Kultur (2.4.1) sowie die weitere Vorgehensweise entsprach der in 2.4.6 beschriebenen.

#### **2.4.9 Kopplung von Sulfamethoxypyridazin (SMP) an ein synthetisches Thiol-Linker Molekül (I)**

Für ein weiteres Selektions-Verfahren wurde Sulfamethoxypyridazin über die benzenringständige Amino-Gruppe an ein C12-Linker Molekül mit terminaler Thiol-Gruppe (SMP-Thiol; 2.1.15; Dickopf *et al.* 2004) gekoppelt. Eine nachfolgende Immobilisierung der Konjugate an entsprechende Mikrotiterplatten ist durch die Maleimid-Chemie für Sulfhydryl-Gruppen prinzipiell gewährleistet. Die Herstellung der Konjugate erfolgte durch die Firma Graffinity (Heidelberg). Die Konjugate wurden von der Firma massenspektrometrisch verifiziert und quantifiziert.

#### **2.4.10 Kopplung von Sulfamethoxypyridazin (SMP) an ein synthetisches Thiol-Linker Molekül (II)**

Des Weiteren wurde Sulfamethoxypyridazin über die pyridazinringständige Methoxygruppe an ein C9-Linker Molekül mit terminaler Thiol-Gruppe gekoppelt (SMP-VBlink; 2.1.15). Diese Art der Derivatisierung erhält die in allen Sulfonamiden übereinstimmende funktionelle Gruppe (Abb. 1.1). Das Konjugat wurde per Auftragssynthese durch die Firma Kadem Custom Chem (Göttingen) hergestellt. Es wurde durch die Firma massenspektrometrisch verifiziert und quantifiziert.

#### **2.4.11 Selektion von SMP-spezifischen scFv-Phagen an Maleimid-aktivierten Mikrotiterplatten**

Die Selektion von SMP-spezifischen scFv-Phagen an Maleimid-aktivierten Mikrotiterplatten wurde mit Modifikationen nach Viti *et al.* (2000) durchgeführt. Es wurden „Reacti Bind™ Maleimide Activated Plates“ der Firma Pierce (Perbio Science, Bonn) verwendet. Diese Mikrotiterplatten haben eine Bindungskapazität von 100 bis 150 pmol SH-Gruppen tragender Liganden pro

Vertiefung. Das SMP-Konjugat der Firma Graffinity (SMP-Thiol) wurde in drei verschiedenen Konzentrationen verwendet. Es wurden 400, 100 und 25 pmol des Liganden verdünnt in Pi-Puffer (200 mM Pi, 10 mM EDTA in H<sub>2</sub>O) pro Vertiefung zur Immobilisierung eingesetzt. Für jede Verdünnung wurde getrennt eine Phagenselektion durchgeführt. Das SMP-Konjugat der Firma Kadem Custom Chem (SMP-VBlink) wurde in einer Konzentration von 250 pmol pro Vertiefung verdünnt in PBS eingesetzt. In der ersten Selektionsrunde wurden je 100 µl des jeweiligen Liganden in 4 Vertiefungen der Mikrotiterplatten gegeben und 16 h unter Bewegung (Taumeltisch WT12, Biometra, Göttingen) bei RT inkubiert. Die Ligandenlösungen wurden abgenommen und die Vertiefungen dreimal mit je 200 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden nicht abreagierte Gruppen durch Zugabe von je 100 µl einer Mercaptoethanol-Lösung (56,9 µM β-Mercaptoethanol in H<sub>2</sub>O) und 1 h Inkubation unter Bewegung bei RT (s.o.) abgesättigt. Zusätzlich wurden in der ersten Selektionsrunde 10 Vertiefungen für eine Präselektion in gleicher Weise behandelt. Die Vertiefungen wurden wie oben beschrieben gewaschen und zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen mit je 100 µl einer Roti® Block 1:10 Gebrauchslösung (Carl Roth, Karlsruhe) für 2 h unter Bewegung bei RT (s.o.) inkubiert. Es wurde erneut wie oben angegeben gewaschen. Anschließend wurden  $1 \times 10^{12}$  scFv-Phagen der ETH-2 Bank (2.1.6) in 200 µl PBS mit Roti® Block 1:100 gelöst und zu je 20 µl auf die 10 Präselektions-Vertiefungen verteilt. Es wurde 2 h wie oben inkubiert, anschließend wurden die präselektierten Phagen vereinigt und zu je 50 µl auf die 4 Selektions-Vertiefungen verteilt. Es folgte eine 2 stündige Inkubation (s.o.), in deren Anschluss 15 mal mit je 200 µl PBS-Tween gewaschen wurde. Die Elution erfolgte durch Zugabe von je 100 µl 0,1 M Glycin HCl pH 2,8 und 15 min Inkubation bei RT. Anschließend wurde sofort durch Zugabe von 100 µl 1 M PBS neutralisiert. Von den vereinigten Eluaten der 4 Selektions-Vertiefungen, sowie ausgewählten Fraktionen wurden Titerbestimmungen (2.4.14) durchgeführt. Die übrigen eluierten scFv-Phagen wurden dann wie unter 2.4.6 beschrieben für die Infektion einer exponentiell wachsenden *E. coli* XL1-Kultur verwendet. Auch die weitere Vorgehensweise entsprach der unter 2.4.6 beschriebenen. Eine Präselektion wurde vor jeder Selektionsrunde (SMP-Thiol) bzw. nur vor den ersten beiden Selektionsrunden (SMP-VBlink) durchgeführt. Die Selektion spezifischer scFv-Phagen erfolgte ab

der zweiten Runde an nur 2 Liganden-gekoppelten Vertiefungen der Mikrotiterplatten.

#### **2.4.12 Amplifikation der scFv-Phagen**

Die re-infizierten XL1 bzw. TG1 Zellen (2.4.4 und 2.4.6) wurden mithilfe eines Glas-Drigalskispatels und 2 bis 10 ml 2 x TY-Medium mit 15 % (v/v) Glycerin vorsichtig von den beiden großen TYE<sup>+AMP+Glc</sup>-Platten abgeschabt und vereinigt. Mit der entstehenden Bakteriensuspension wurden 50 ml 2 x TY-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 1 % (w/v) Glukose bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,05 bis 0,1 angeimpft. Die übrige Suspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Bei Arbeiten mit der Griffin.1 Bank wurde diese Kultur direkt aus einer Übernachtskultur angeimpft (2.4.4). Die Flüssigkultur wurde, wie unter 2.4.1 beschrieben, angezogen bis die exponentielle Wachstumsphase erreicht war. 10 ml dieser Kultur (~5x10<sup>9</sup> Bakterien) wurden dann im Verhältnis 1:20 (1x10<sup>11</sup> pfu) mit dem Helferphagen (Hyperphage, PROGEN bzw. VCSM13, Stratagene) infiziert. Es wurde für 10 min bei 3300 x g und RT zentrifugiert und das Pellet wurde in 100 ml 2 x TY mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin aufgenommen. Die Amplifikation der scFv-Phagen erfolgte je nach Panningstrategie für 12 bis 18 h bei 30 °C und 220 Upm.

#### **2.4.13 PEG-Fällung der amplifizierten scFv-Phagen**

Die amplifizierten scFv-Phagen wurden mittels PEG-Fällung aus dem Kulturüberstand aufkonzentriert. Dazu wurde die Kultur für 10 min bei 10800 x g und 4 °C abzentrifugiert. Dem Überstand wurde 1/5 Volumen PEG/NaCl-Lösung (20 % (w/v) PEG 6000, 2,5 M NaCl) zugegeben und es wurde 1 h auf Eis und unter Bewegung (Taumeltisch WT12, Biometra, Göttingen) inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 30 min bei 10800 x g und 4 °C (s.o). Das Pellet wurde in 10 ml sterilem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Erneut wurde 1/5 Volumen PEG/NaCl-Lösung zugegeben und es wurde für 20 min wie oben angegeben inkubiert. Die präzipitierten scFv-Phagen wurden durch erneute Zentrifugation pelletiert. Anschließend wurden die Phagen in 1 ml PBS mit 15 % (v/v) Glycerin aufgenommen und es wurde eine Titerbestimmung (2.4.14) durchgeführt. Die längerfristige Lagerung der übrigen Phagen erfolgte bei -80 °C.



#### 2.4.14 Titerbestimmung von Phagensuspensionen

Für Titerbestimmungen wurde je nach Versuch eine *E. coli* TG1 oder XL1 Kultur aus einer ÜNK angeimpft und wie unter 2.4.1 beschrieben bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,5 angezogen. Von der entsprechenden Phagensuspension wurden Verdünnungen in PBS hergestellt. Ein 50 µl Aliquot der Bakterienkultur wurde dann mit 1/100 Aliquot der jeweiligen Verdünnungsstufe infiziert. Anschließend wurden die Ansätze auf Selektionsmedium ausplattiert. Bei Arbeiten mit der Griffin.1 Bank wurde LB<sup>+Amp</sup>-Agar verwendet, bei allen anderen hingegen TYE<sup>+Amp+Glc</sup>-Agar. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Kolonien am nächsten Tag ausgezählt.

#### 2.4.15 Analyse von selektierten scFv-Klonen über Immunfärbung

Selektierte scFv-Klone wurden mittels Kolonie-PCR (2.2.11) auf Vollständigkeit der scFv-Inserts analysiert. Solche Klone, die ein vollständiges scFv Gen trugen, wurden anschließend auf Exprimierbarkeit dieses Gens hin untersucht. Dazu wurden 5 ml Expressionskulturen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,8 angezogen und anschließend mit 0,5 bis 1 mM IPTG ÜN induziert. Die Kulturen wurden für 10 min bei 6000 x g und RT abzentrifugiert. Mit Aliquots der Kulturüberstände wurde eine SDS-PAGE (2.3.8) mit anschließendem Western Blot und Immunfärbung (2.3.11 und 2.3.13) durchgeführt. Als erster Antikörper wurde dabei der „His Tag (27E8) Monoclonal Antibody“ bzw. der „ANTI-FLAG<sup>®</sup> M2 Monoclonal Antibody“ (s.Tab. 2.5) verwendet. Klone, die eine 34 kDa große Bande in der Immunfärbung ergaben, wurden als exprimierbar eingestuft.

#### 2.4.16 Analyse von selektierten scFv-Klonen über die Deoxycholat-Methode

Eine Alternative zu der in Abschnitt 2.4.15 beschriebenen Vorgehensweise stellt die Deoxycholat-Methode nach Li *et al.* (2002) dar. Diese basiert auf der Veränderung der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien durch das Bakteriophagen f1 *gene III* Protein (pIII, „minor coat protein“) (Boeke und Model 1982). Die Expression des pIII (Fusions-) Proteins führt zu einer Empfindlichkeit der Wirtsbakterien unter anderem gegenüber dem Detergenz Deoxycholat, was zu einem reduzierten Wachstum auf DOC-haltigem Medium führt (Li *et al.* 2002). Die Durchführung erfolgte wie bei Li *et al.* (2002) beschrieben.

## 2.5 Massenspektrometrie

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten Sulfonamid-Biotin Konjugate (2.4.7) wurden massenspektrometrisch analysiert. Dieses erfolgte mithilfe einer LC-MS QP8000a (Shimadzu, Duisburg) unter Anwendung folgender Messparameter:

Detector gain	1,7 kV
Probe Temp.	400 °C
CDL Temp.	230 °C
Probe bias	+ 4,5 / - 3,0 kV
Mass range	100 -750
Flow	0,3 ml/min
Messmodi	APCI positiv und negativ

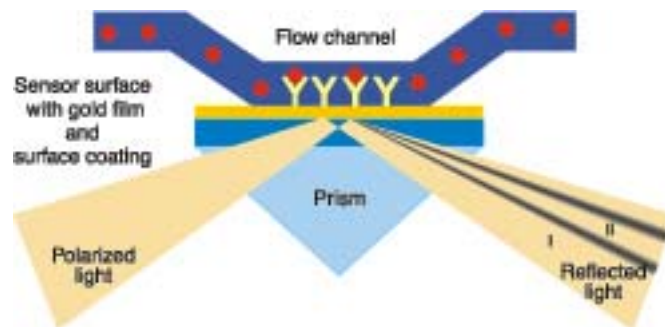
## 2.6 Bestimmung der Affinität von Antikörperfragmenten

Die Charakterisierung von Antikörperfragmenten hinsichtlich ihrer Spezifität und Affinität erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mithilfe eines Biacore 3000 Gerätes an entsprechenden Sensor-Chip Oberflächen.

### 2.6.1 Grundlagen der Biacore-Technologie

Bei der Biacore 3000 handelt es sich um einen Biosensor (Lowe, 1985), der unter Ausnutzung des optischen Phänomens der Oberflächenplasmonresonanz (Cullen *et al.* 1987, Liedberg *et al.* 1983) Molekülinteraktionen markierungsfrei und in Echtzeit detektiert (Jönsson *et al.* 1991). Oberflächenplasmonresonanz (SPR) tritt unter Bedingungen der totalen internen Reflexion einfallenden polarisierten Lichtes in dünnen Metallfilmen auf. Sensor-Chips für Biacore-Anwendungen bestehen daher aus einer Glasschicht, die mit einer dünnen Goldschicht beschichtet ist. Auf der lichtabgewandten Seite ist sie zusätzlich mit einer flexiblen hydrophilen Matrix aus Carboxymethyldextran derivatisiert, die eine kovalente Immobilisierung von Liganden ermöglicht (Jönsson *et al.* 1991, Jönsson *et al.* 1991, Löfås und Johnson 1990). Diese Seite des Chips steht in direkter Verbindung zu einer Flusszelle über die der zu untersuchende Analyt

mit einem kontinuierlichen Pufferstrom in die Nähe des immobilisierten Liganden gebracht wird (Abb. 2.7).

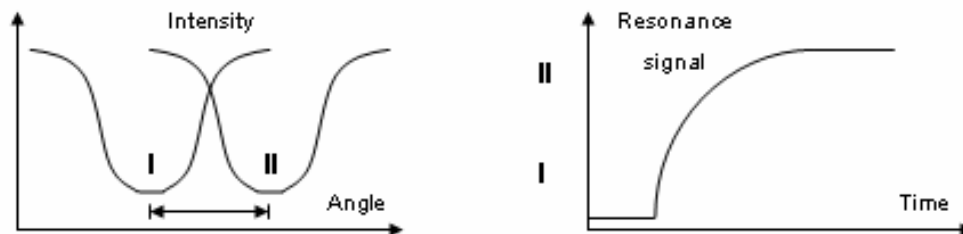


Quelle: Biacore (Uppsala, Schweden)

**Abb. 2.7 Prinzip der Biacore-Technologie.** Schematisch dargestellt ist eine Flusszelle, die an die Dextran-beschichtete Oberfläche eines Sensor-Chips angrenzt, wodurch ein direkter Kontakt mit dem daran gekoppelten Liganden hergestellt wird. Auf den darunter liegenden Goldfilm wird über ein Prisma polarisiertes Licht eingestrahlt. Eine Massenzunahme an der Sensorchip-Oberfläche, wie sie durch Bindung eines Analyten an den Liganden entsteht, bewirkt eine Veränderung des Brechungsindex der umgebenden Lösung und damit des Reflektionswinkels des reflektierten Lichtes.

Tritt Licht einer definierten Wellenlänge in einem bestimmten Einfallswinkel über das Prisma in den Metallfilm, werden die delokalisierten Oberflächenelektronen in der Grenzschicht zwischen Metall und externem Medium (Flusszelle) vorübergehend zu einer kollektiven, elektromagnetischen Bewegung angeregt, die als „Oberflächenplasmon“ bezeichnet wird (Cullen *et al.* 1987). Folglich wird Energie des einfallenden Lichtes auf die Oberflächenelektronen übertragen, was zu einer Abnahme der Intensität des reflektierten Lichtes in einem bestimmten Reflektionswinkel führt (Cullen *et al.* 1987). Verschiedene Faktoren wie die Wellenlänge und der Polarisierungsgrad des einfallenden Lichtes, die optischen Eigenschaften der Glasoberfläche und des Metallfilms sowie die optischen Eigenschaften insbesondere der Brechungsindex des an die Metallschicht angrenzenden Mediums beeinflussen diesen Winkel. Werden alle anderen Faktoren konstant gehalten, beschreibt die Veränderung des Reflektionswinkels direkt die Veränderung des Brechungsindex des angrenzenden Mediums (Jönsson *et al.* 1991). Bindungsereignisse zwischen dem immobilisierten Liganden und einem Analyten führen zu einer Veränderung dieses Brechungsindexes und werden so, als Folge der SPR und der damit verbundenen Veränderung des Reflektionswinkels des Lichtintensitätsminimums, messbar. Das Ausmaß der Veränderung dieses Winkels wird als

SPR-Antwort bezeichnet. Trägt man sie im Verlauf einer Messung gegen die Zeit auf, so entsteht ein Sensorgramm (Abb. 2.8). Als Maßeinheit wurde die sog. Resonanzeinheit („resonance unit“, RU) definiert.



Quelle: Biacore (Uppsala, Schweden)

**Abb. 2.8 Entstehung eines Sensorgramms.** Die Bindung eines Analyten an den Liganden an der Sensorchip Oberfläche führt zu einer Veränderung des Brechungsindex der umgebenden Lösung und damit zu einer Veränderung des Reflektionswinkels reflektierten Lichtes (linke Abb.). Trägt man die Veränderung dieses Winkels gegen die Zeit auf, so erhält man ein Sensorgramm (rechte Abb.).

Nach Stenberg *et al.* (1991) sind für Proteine Änderungen des Brechungsindex proportional zur Massenzunahme an der Sensoroberfläche. Eine SPR-Antwort von 1 RU entspricht bei Proteinen einer Veränderung der Oberflächenkonzentration von  $1 \text{ pg/mm}^2$  (Jönsson *et al.* 1991).

### 2.6.2 Kopplung der Sensor-Chips

Die Derivatisierung der Chip-Oberfläche mit einer flexiblen hydrophilen Matrix aus Carboxymethyldextran ermöglicht die kovalente Immobilisierung von Liganden (Jönsson *et al.* 1991). Je nach Anwendung stehen verschiedene Kopplungsmechanismen und Sensor-Chips zu Verfügung. Die kovalente Kopplung erfolgt dabei unter anderem basierend auf nukleophilen Austauschreaktionen an N-hydroxysuccinimid (NHS) Estern (Jönsson *et al.* 1991), Thiol/Disulfid-Austauschreaktionen oder unter Ausnutzung der natürlichen Streptavidin-Biotin-Bindung (Jönsson *et al.* 1995). An der Biacore 3000 stehen vier Flusszellen pro Chip zur Verfügung von denen jeweils 2 (1-2 und 3-4) in Reihe geschaltet werden können. Die Immobilisierung von SA-Biotin bzw. SMP-Biotin (2.4.7) erfolgte bei neutralem pH an die zweite Flusszelle eines mit Streptavidin beschichteten SA-Chips der Firma Biacore AB (Uppsala, Schweden). An die erste Flusszelle wurde in gleicher Weise das Biotin-Linker Molekül (2.1.14) gekoppelt, so dass die Zelle als interne Negativkontrolle

verwendet werden konnte. Die beiden Thiol-Linker Moleküle (2.1.15) wurden unter Verwendung des „Thiol Coupling Kits“ (Biacore AB, Uppsala, Schweden) an die zweite Flusszelle eines CM5-Chips (Biacore AB, Uppsala, Schweden) gekoppelt. Die Durchführung erfolgte mit Modifikationen nach Angaben des Herstellers. Auch hier wurde die erste Flusszelle als Negativkontrolle aktiviert, derivatisiert und deaktiviert.

### **2.6.3 Affinitätsmessungen**

Zur Bestimmung der Affinität von Antikörperfragmenten mithilfe der Biacore 3000 wurden diese in HBS-EP Puffer umgepuffert (2.3.6) und die Konzentration wurde photometrisch bestimmt (2.3.7). Anschließend wurden Verdünnungen in HBS-EP hergestellt. Flusszelle 1 und 2 wurden für die Messungen in Reihe geschaltet. Das Signal der Flusszelle 1 (Negativkontrolle) wurde automatisch von dem der Flusszelle 2 abgezogen, so dass ein Referenz-subtrahiertes Sensorgramm entstand. Für kinetische Messungen wurden die Proben in zweifacher Wiederholung für 3 min bei einer Flussrate von 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  und einer Temperatur von 25 °C injiziert. Es folgte eine Dissoziationsphase von 10 min. Nach jeder Injektion wurde die Chip-Oberfläche mit 10 mM Glycin HCl pH 2,5 (30 s bei 30  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) regeneriert. Vor jeder erneuten Injektion erfolgte eine Stabilisierungsphase von 2 min. Für Kompetitionen mit freiem Sulfonamid wurden jeweils 500 nM scFv mit unterschiedlichen Konzentrationen des Sulfonamids (0 bis 50  $\mu\text{M}$ ) für 30 min bei RT inkubiert und anschließend wie oben beschrieben injiziert. Da das Sulfonamid anteilig in DMSO gelöst vorlag, wurde einer zusätzlichen Negativkontrolle die entsprechende DMSO-Konzentration zugesetzt.

## **2.7 Computergestützte Bearbeitung und Auswertung von Biacore-Daten**

Die Auswertung von Biacore-Daten erfolgte mithilfe der BIA Evaluation Software Version 4.1 der Firma Biacore AB (Uppsala, Schweden) unter Verwendung des 1:1 Langmuir bzw. des „Heterogeneous analyte (competing reactions)“ Bindungsmodells. Dissoziationskonstanten wurden nach den allgemeinen Programmstandards berechnet.

## **2.8 Modellierung der Antikörperfragmente**

Die Berechnung der 3D-Struktur der Antikörperfragmente erfolgte über ein „Threading“ basierend auf dem WAM-Algorithmus (Whitelegg und Rees, 2000; Whitelegg und Rees, 2004). Für die Visualisierung und Bearbeitung der pdb-Dateien wurde das Programm „3D Molecule Viewer“ (Vector NTI Advance 10, Invitrogen) verwendet.

## **2.9 Computergestützte Bearbeitung und Auswertung von DNA-Sequenzen**

DNA-Sequenzen wurden mithilfe der Software VectorNTI der Firma Informax, Inc. (U.S.A) sowie Lasergen 6 der Firma DNASTar, Inc. (U.S.A) analysiert und verglichen. Des Weiteren wurden hierzu die Programme ClustalX (Thompson *et al.* 1997) und treeviewer32 verwendet.

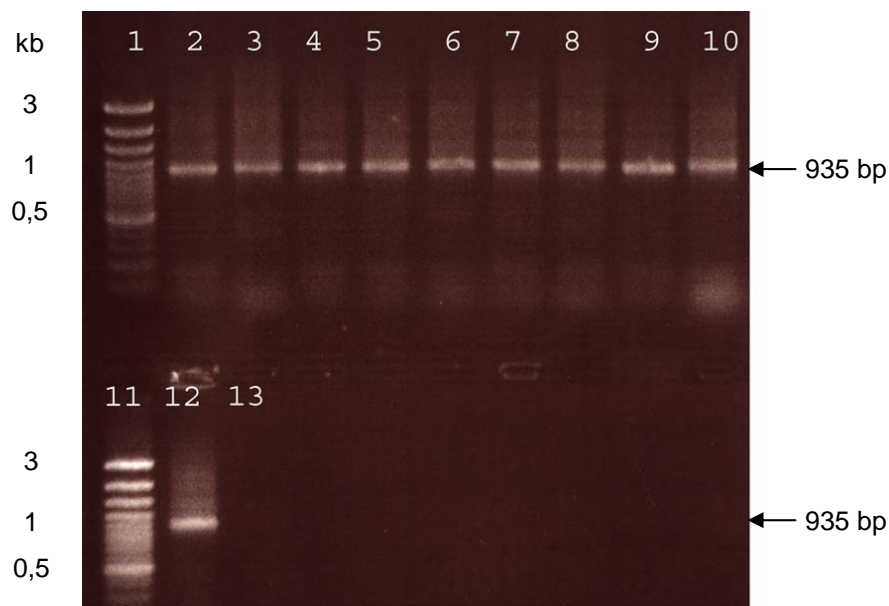
## **2.10 Molekulare Analyse der Sulfonamid-Konjugate**

Die molekulare Analyse der im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Sulfonamid-Konjugate hinsichtlich ihrer physiko-chemischen Eigenschaften erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms Hyperchem 7 Molecular Modelling Systems (Hercube, Inc).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Die Antikörpergenbibliotheken

Zur Selektion auf antigenspezifische scFv-Phagen wurde bevorzugt die semisynthetische ETH-2 Bank (Viti *et al.* 2000) eingesetzt. Diese lag in ihrer ursprünglichen, das heißt nicht-reamplifizierten Form vor, was nahe legt, dass die meisten ihrer scFv-Klone ein vollständiges scFv-Gen aufweisen sollten. Sie wurde von der ETH Zürich in Form von vier Subbanken ETH-2-1, ETH-2-1a, ETH-2-1b und ETH-2-1c zur Verfügung gestellt. Um diese vor dem Einsatz in den Selektionen dennoch auf Vollständigkeit der scFv Gene hin zu überprüfen, wurden von den einzelnen Ansätzen Verdünnungsausstriche angefertigt und jeweils 10 Einzelkolonien mittels Kolonie PCR überprüft.



**Abb. 3.1 Kontrolle der scFv Bank ETH-2 auf vollständige Antikörperfragmente.** Dargestellt ist das Ergebnis einer Kolonie-PCR, die zur Kontrolle der ETH-2 Bank auf vollständige Antikörperfragmente durchgeführt wurde. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in 1 % Agarose-Gelen bei 90 V für 45 min. In Bahn 1 und 11 sind je 5 µl der 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas) aufgetragen. In Bahn 2 bis 12 sind die Kolonie-PCR-Produkte 1 bis 10 aufgetragen (je 10 µl + 2 µl Loading Dye Solution), in Bahn 13 in gleicher Weise eine Negativkontrolle. Ein vollständiges scFv Gen ergibt durch Amplifikation mit den Primern LMB3 und fdSeq ein PCR-Fragment von 935 bp. Insgesamt wurden 40 Einzelkolonien überprüft, von denen alle das erwartete PCR-Fragment aufwiesen.

Ein vollständiges scFv Gen ergibt durch Amplifikation mit den Primern LMB3 und fdSeq ein PCR-Fragment von 935 bp. Nach Auftrennung der PCR-Ansätze

in 1% (w/v) Agarosegelen wiesen alle untersuchten Kolonien diese Bande auf. In Abb. 3.1 ist das Ergebnis für die Subbank ETH-2-1b dargestellt. Die vier Subbanken wurden anschließend amplifiziert und durch Infektion der *E. coli* Zellen mit dem Helferphagen VCS M13 wurden lösliche scFv-Phagen hergestellt. Die scFv-Phagen der vier Subbanken wurden vereinigt und mittels PEG/NaCl gefällt (2.4.13). Der Phagentiter der resultierenden Suspension betrug  $3,9 \times 10^{13}$  cfu/ml.

Im Gegensatz dazu wiesen in der semisynthetischen Griffin.1 Bank rund 84 % der selektierten Phagen kein vollständiges scFv Gen auf (s. Tab. 3.8). Diese Bank war vor ihrer Anwendung im Rahmen dieser Arbeit bereits häufig reamplifiziert worden.

### 3.2 Immobilisierungsstrategien und Sulfonamid-Derivate

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Immobilisierungs-Prinzipien mit sechs verschiedenen Sulfonamid-Konjugaten durchgeführt (Tab. 3.1).

**Tab.3.1 Immobilisierungsstrategien.** Dargestellt sind die Strategien, über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgewählte Sulfonamide bzw. Sulfonamid-Konjugate an feste Oberflächen gekoppelt wurden. Die Immobilisierung der Sulfonamide bildet die Grundlage für die Selektion Sulfonamid-spezifischer scFv-Phagen im Rahmen des „Phage Displays“.

Oberfläche	Immobilisierungsprinzip	Sulfonamid-Derivat	Für Selektion verwendete scFv Bank
Magnetic beads SiMAG Cl bzw. TCI	Direkt; über CH <sub>2</sub> Cl- bzw. COOH- Gruppe der beads	SMP	Griffin.1
		SMP	ETH-2
Streptavidin- gekoppelte Mikrotiterplatten	Indirekt; über Sulfonamid- Biotin-Linker Derivat	SA-Biotin	ETH-2
		SMP-Biotin	ETH-2
Maleimid- aktivierte Mikrotiterplatten	Indirekt; über Sulfonamid- Thiol-Linker Derivat	SMP-Thiol	ETH-2
		SMP-VBlink	ETH-2

Zunächst wurde Sulfamethoxypyridazin (SMP) an die Oberfläche zweier verschiedener „magnetic beads“ SiMAG Cl und TCI gekoppelt. Dieses erfolgte



in direkter Weise über die benzenringständige primäre Amino-Gruppe des SMP-Moleküls (2.1.13). Die Kopplungsreaktionen erfolgten als nukleophile Substitutionsreaktion basierend auf der Carbodiimidmethode (Albers *et al.* 2002). Die Ausbeute der Kopplungsreaktionen konnte in diesem experimentellen Ansatz aus technischen Gründen nicht quantifiziert werden. Die Literaturlage legt aber nahe, dass eine Immobilisierung mit hinreichender Ausbeute erfolgt. Daher wurden basierend auf dieser Immobilisierungsstrategie Selektionen auf antigenspezifische scFv-Phagen vorgenommen.

Im Weiteren wurden Sulfanilamid (SA) und Sulfamethoxypyridazin (SMP) durch Kopplung an EZ-Link<sup>®</sup> NHS-LC-Biotin (2.1.14) derivatisiert. Für den Einsatz in nachfolgenden Selektionen wurden diese Derivate an Streptavidin-gekoppelten Mikrotiterplatten immobilisiert. Der Derivatisierungserfolg der beiden Sulfonamide wurde massenspektrometrisch überprüft (2.5). Die zu erwartenden Molekulargewichte der Biotin-Derivate betrugen 511 g/mol für SA- und 620,84 g/mol für SMP-Biotin. SA-Biotin konnte unter Anwendung der Messmodi APCI positiv und negativ als peak von 512 bzw 510 molekularer Masse nachgewiesen werden (Abb 3.2). Des Weiteren traten unmodifiziertes EZ-Link<sup>®</sup> NHS-LC-Biotin als peak von 455 (APCI pos.) und freies Sulfanilamid als peak von 171 (APCI neg.) molekularer Masse auf. Das erwartete Molekulargewicht von SMP-Biotin konnte aus technischen Gründen nicht nachgewiesen werden. Innerhalb der Selektionen auf antigenspezifische scFv-Phagen wurde daher mit einem hohen Überschuss des SMP-Biotin Kopplungsgemisches gearbeitet.

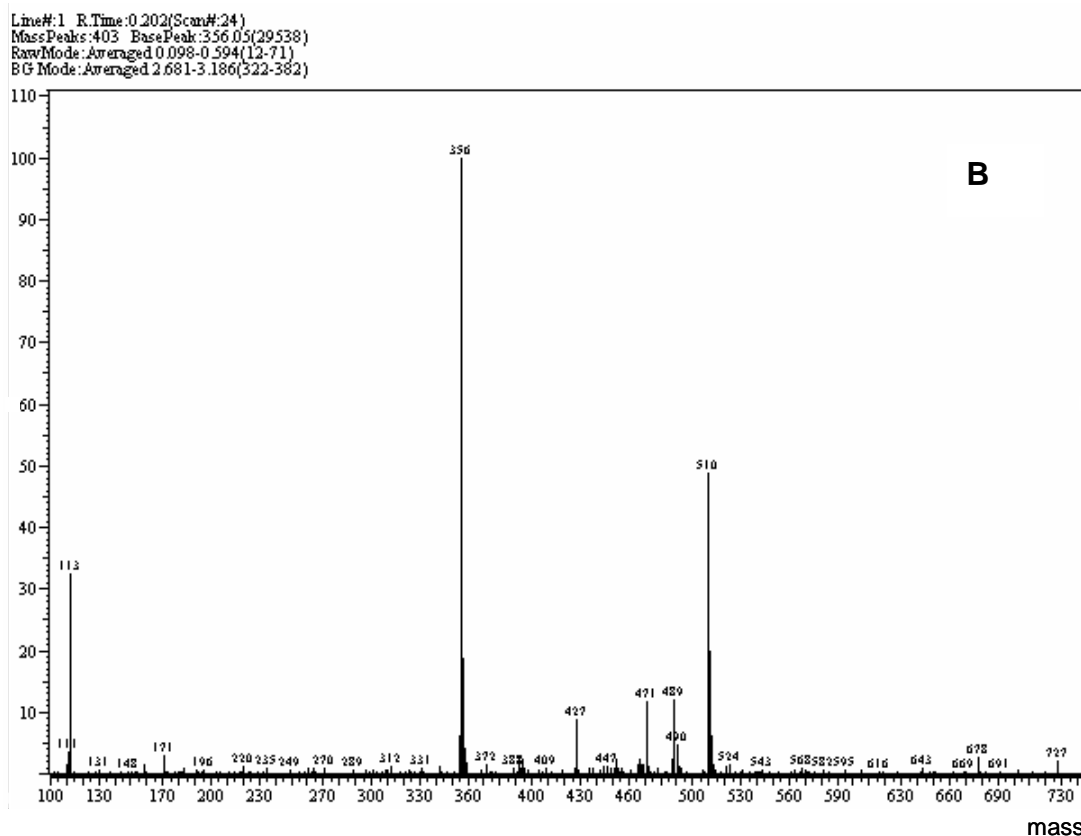
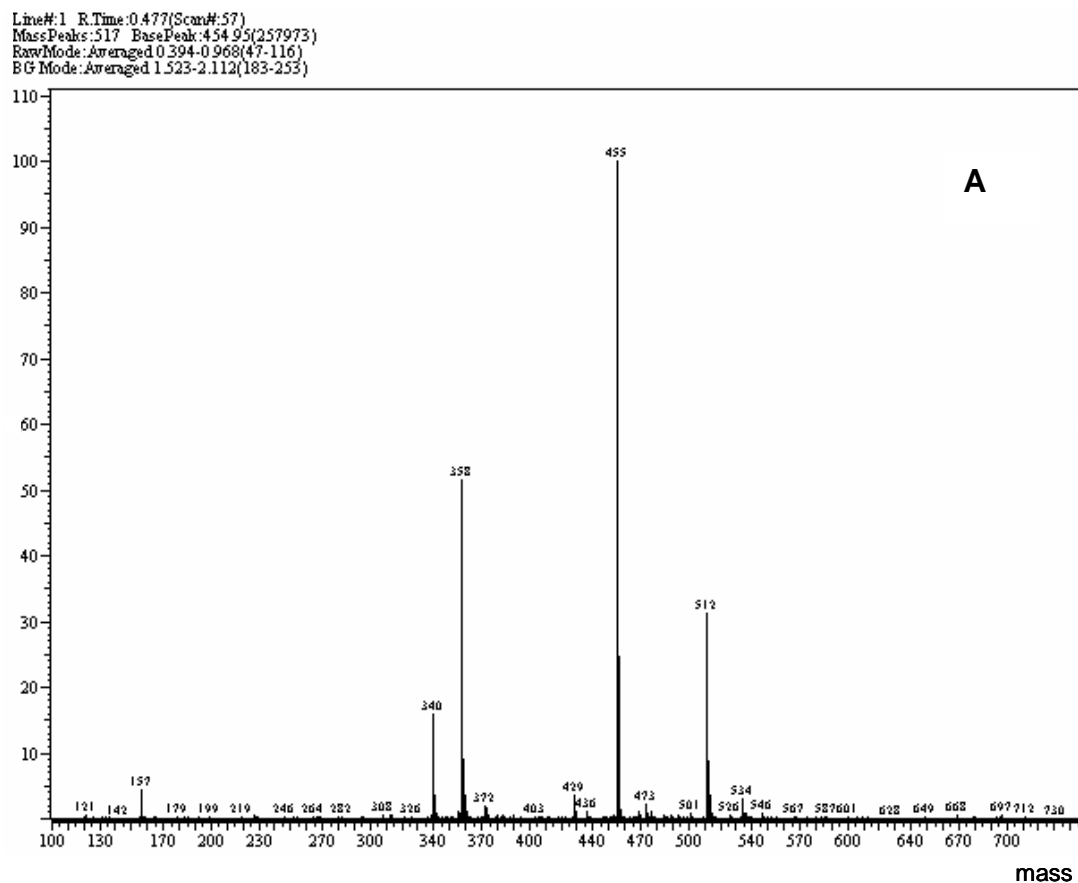


Abb 3.2 LC-MS-Spektrum von SA-Biotin. Messmodi APCI positiv (A) und negativ (B)

Darüber hinaus wurde Sulfamethoxypyridazin (SMP) an zwei unterschiedliche Thiol-Linker Moleküle gekoppelt (2.1.15). Dieses erfolgte durch die Firmen Graffinity Pharmaceutical Design (Heidelberg) und Kadem Custom Chem (Göttingen). Die resultierenden Derivate wurden von den Firmen massenspektrometrisch verifiziert und quantifiziert. Abb. 3.3 zeigt exemplarisch die Struktur des über NMR und MS verifizierten SMP-VBlink Liganden der Firma KDMCC. Die terminale SH-Gruppe der Linker Moleküle ermöglicht eine Immobilisierung der Derivate basierend auf der Maleimid-Chemie für Sulfhydryl-Gruppen. Die Reaktion von Maleimiden gehört zu den einfachsten und vollständigsten chemischen Immobilisierungsstrategien und wurde aufgrund dieser Eigenschaften zur Kopplung des Sulfamethoxypyridazins ausgewählt.

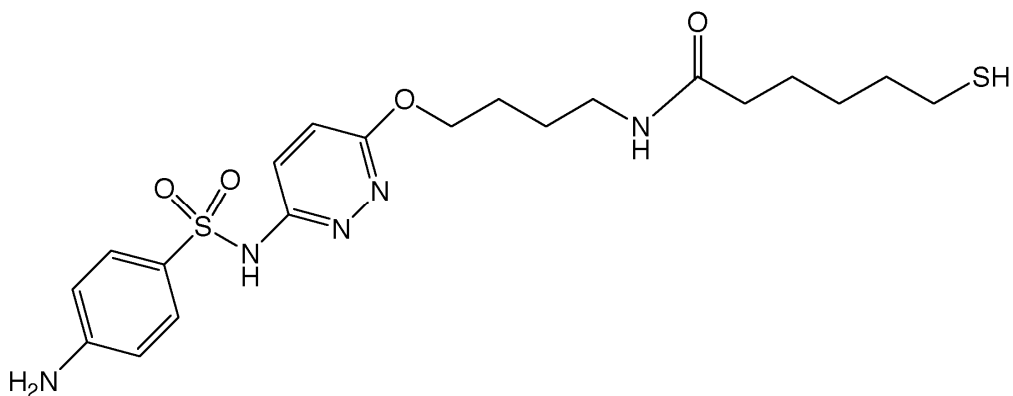


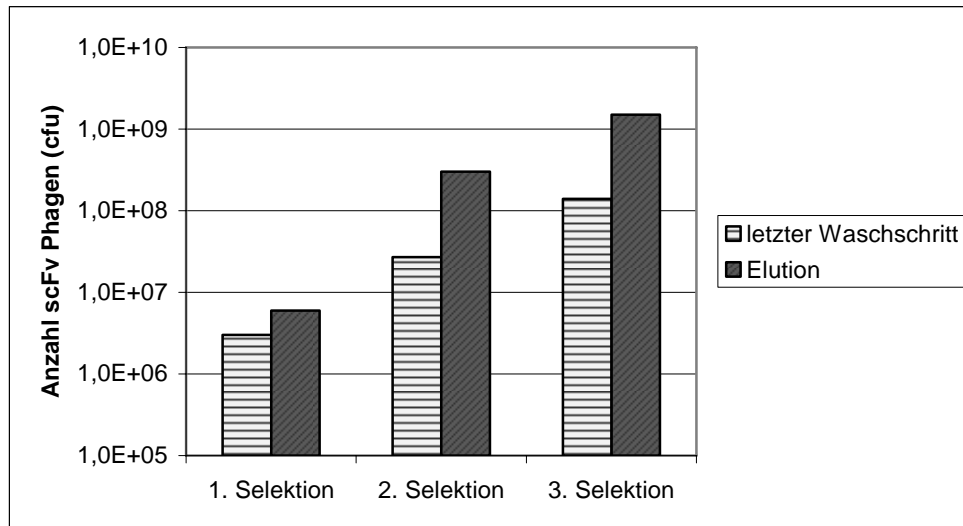
Abb. 3.3. SMP-VBlink Konjugat

### 3.3. Selektion auf Antigen-spezifische scFv-Phagen („Panning“)

#### 3.3.1 Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an SMP-gekoppelten SiMAG CI beads (Griffin.1 Bank)

Zur Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an SMP-gekoppelten SiMAG CI beads wurden drei Selektionsrunden durchgeführt. In der ersten Selektionsrunde wurden  $1 \times 10^{12}$  scFv-Phagen zur Selektion eingesetzt. Da in den folgenden Runden nur relativ geringe Phagentiter amplifiziert werden konnten, wurden in der zweiten Selektionsrunde nur  $2 \times 10^{11}$  und in der dritten Selektionsrunde nur  $8 \times 10^{11}$  scFv-Phagen eingesetzt. Nach Bindung der Phagen an das Antigen erfolgten insgesamt 25 Waschschrte (2.4.4). Die Abbildung 3.4 zeigt in logarithmischer Darstellung den Verlauf der Phagentiter

für den letzten dieser Waschschriffe sowie für die saure Elution mit Glycin HCl pH 2,2. In Tabelle 3.2 sind die absoluten Werte aufgeführt. Im Verlauf der drei Selektionsrunden zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Phagentiter beider Proben. Die Phagentiter des Eluats stiegen dabei in stärkerem Ausmaß, als die des letzten Waschschriffs.



**Abb. 3.4 Drei Selektionsrunden an Sulfamethoxypyridazin-gekoppelten SiMAG CI beads.** In der ersten Selektionsrunde wurden  $10^{12}$  scFv-Phagen der Griffin.1 Bank zur Selektion eingesetzt. In der zweiten und dritten Runde wurden  $2 \times 10^{11}$  bzw.  $8 \times 10^{11}$  scFv-Phagen, amplifiziert aus der jeweiligen Selektionsrunde verwendet. Angegeben sind die Phagentiter in Kolonie-bildenden Einheiten („colony forming units“, cfu) für den letzten Waschschrift und die saure Elution mit Glycin HCl pH 2,8.

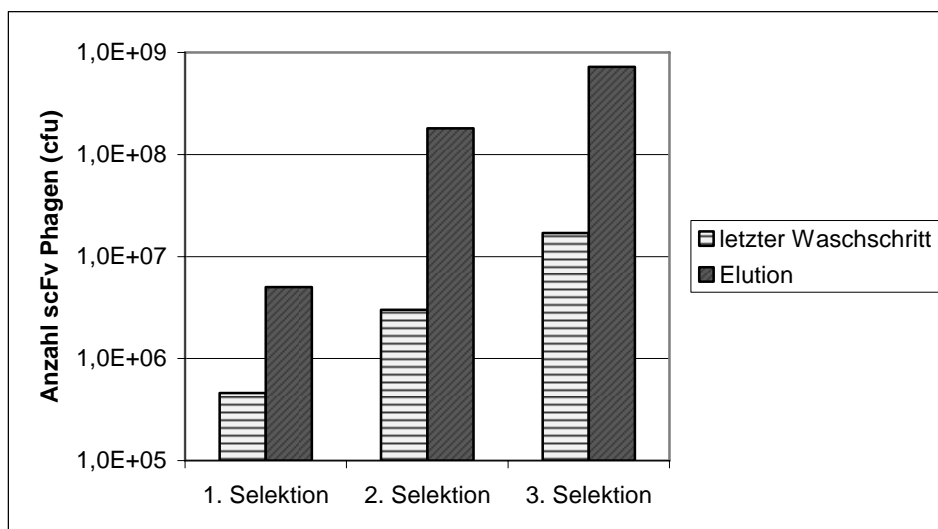
**Tab. 3.2 Absolute Werte der Titerbestimmungen (Selektion an SMP-gekoppelten SiMAG CI beads). Angabe in cfu**

	1. Selektion	2. Selektion	3. Selektion
letzter Waschschrift	$3 \times 10^6$	$2,7 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$
Elution	$6 \times 10^6$	$3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^9$

### 3.3.2 Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an SMP-gekoppelten SiMAG TCI beads (ETH-2 Bank)

In ähnlicher Weise wie unter 3.3.1 beschrieben, erfolgte auch die Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an SMP-gekoppelten SiMAG TCI beads. Dabei wurden für die erste Selektionsrunde  $1 \times 10^{12}$  scFv-Phagen der ETH-2 Bank zur Selektion eingesetzt, in der zweiten und dritten Runde jeweils  $4 \times 10^{11}$  bzw.  $1 \times 10^{12}$ . Nach Bindung der Phagen erfolgten hier insgesamt 40 Waschschriffe (2.4.6). In Abbildung 3.5 sind in logarithmischer Skalierung die Verläufe der

Phagentiter für den letzten Waschschrift sowie für die saure Elution mit Glycin HCl pH 2,8 dargestellt. Tabelle 3.3 zeigt die dazugehörigen absoluten Werte. Auch hier zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Phagentiter im Verlauf der drei Selektionsrunden, wobei dieser für die sauren Elutionen in stärkerem Ausmaß erfolgte, als für die Proben der letzten Waschschriffe.



**Abb. 3.5 Drei Selektionsrunden an Sulfamethoxypyridazin-gekoppelten SiMAG TCI beads.** In der ersten Selektionsrunde wurden  $10^{12}$  scFv-Phagen der ETH-2 Bank zur Selektion eingesetzt. In der zweiten und dritten Runde wurden  $4 \times 10^{11}$  bzw.  $10^{12}$  scFv-Phagen, amplifiziert aus der jeweiligen Selektionsrunde verwendet. Angegeben sind die Phagentiter in Kolonie-bildenden Einheiten („colony forming units“, cfu) für den letzten Waschschrift und die saure Elution mit Glycin HCl pH 2,8.

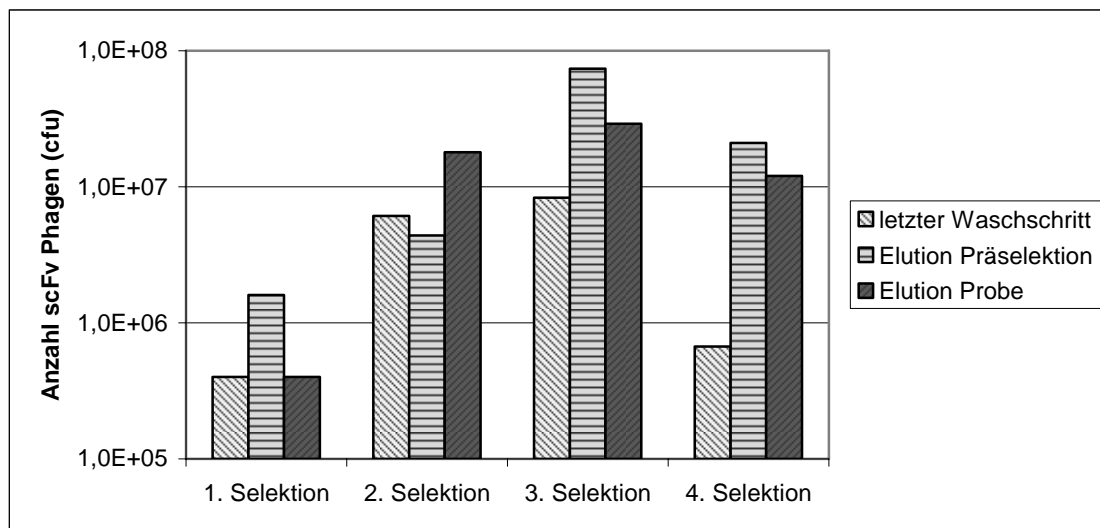
**Tab. 3.3 Absolute Werte der Titerbestimmungen (Selektion an SMP-gekoppelten SiMAG TCI beads). Angaben in cfu**

	1. Selektion	2. Selektion	3. Selektion
letzter Waschschrift	$4,6 \times 10^5$	$3 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$
Elution	$5 \times 10^6$	$1,8 \times 10^8$	$7,2 \times 10^8$

### 3.3.3 Selektion SA-spezifischer scFv-Phagen an Streptavidin-gekoppelten Mikrotiterplatten

Die Selektion Sulfanilamid (SA)-spezifischer scFv-Phagen erfolgte basierend auf dem SA-Biotin Konjugat (2.4.7), welches an Streptavidin-gekoppelte Mikrotiterplatten immobilisiert wurde. Es wurden vier Selektionsrunden unter Verwendung der ETH-2 Bank durchgeführt. Pro Selektionsrunde wurden  $1 \times 10^{12}$  scFv-Phagen eingesetzt. Vor jeder Runde wurde eine Präselektion am unkonjugierten Biotin-Linker durchgeführt (2.4.8). Nach Bindung der Phagen an

das Antigen wurden sowohl die Präselektions- als auch die Selektionsvertiefungen der Platten insgesamt 20 mal gewaschen, die Elution erfolgte mit Glycin HCl pH 2,8 (2.4.8). In Abbildung 3.6 sind die Verläufe der Phagentiter für den letzten Waschschrift, die Elution der Präselektions- sowie die Elution der Selektionsvertiefungen in logarithmischer Skalierung dargestellt. Tabelle 3.4 zeigt die zugehörigen absoluten Werte. Es zeigte sich ein Anstieg aller Phagentiter bis zur dritten Selektionsrunde und ein nachfolgender Abfall in der vierten Runde. Die Phagentiter der Präselektions-Eluate lagen in allen Selektionsrunden, ausgenommen der zweiten, höher als die der eigentlichen Selektions-Eluate.



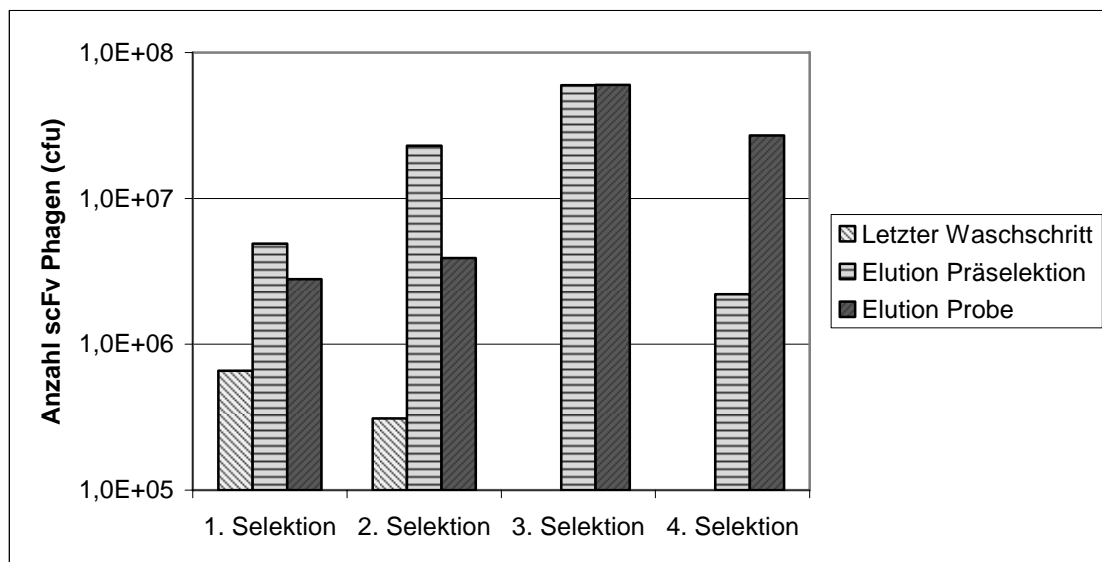
**Abb. 3.6 Vier Selektionsrunden an Sulfanilamid-Biotin, immobilisiert an Streptavidin-gekoppelten Mikrotiterplatten.** In der ersten Selektionsrunde wurden  $10^{12}$  scFv-Phagen der ETH-2 Bank zur Selektion eingesetzt. In allen weiteren Runden wurden ebenfalls  $10^{12}$  scFv-Phagen, amplifiziert aus der jeweiligen Selektionsrunde verwendet. Angegeben sind die Phagentiter in Kolonie-bildenden Einheiten („colony forming units“, cfu) für den letzten Waschschrift, die Elution nach der Präselektion und die saure Elution mit Glycin HCl pH 2,8.

**Tab. 3.4 Absolute Werte der Titerbestimmungen (Selektion an SA-Biotin). Angaben in cfu**

	1. Selektion	2. Selektion	3. Selektion	4. Selektion
letzter Waschschrift	$4 \times 10^5$	$6,1 \times 10^6$	$8,3 \times 10^6$	$6,7 \times 10^5$
Elution Präselektion	$1,6 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	$7,4 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$
Elution Probe	$4 \times 10^5$	$1,8 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$

### 3.3.4 Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an Streptavidin-gekoppelten Mikrotiterplatten

Die Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an Streptavidin-gekoppelten Mikrotiterplatten erfolgte wie unter 2.4.8 und 3.3.3 beschrieben. In der ersten Selektionsrunde wurden  $1 \times 10^{12}$  scFv-Phagen der ETH-2 Bank zur Selektion eingesetzt. Aufgrund relativ geringer Titer nach Amplifikation der Phagen wurden in der zweiten Runde nur  $1 \times 10^{11}$  in allen weiteren Runden nur noch  $1 \times 10^{10}$  scFv-Phagen eingesetzt. Eine Titerbestimmung des letzten Waschschriffs wurde nur in den ersten beiden Selektionsrunden durchgeführt. Der Phagentiter des letzten Waschschriffs sank in der zweiten Selektionsrunde auf etwa die Hälfte des Wertes aus der ersten Runde (Abb. 3.7, Tab. 3.5). Alle anderen Phagentiter stiegen über die ersten drei Selektionsrunden an, um in der vierten Runde wieder zu sinken. Der Phagentiter aus den Präselektionen lag in den ersten beiden Selektionsrunden deutlich über dem aus den Selektionen. Erst in der vierten Selektionsrunde lag der Wert aus der Selektions-Elution etwa eine Zehnerpotenz über dem aus der Präselektions-Elution.



**Abb. 3.7 Vier Selektionsrunden an Sulfamethoxypyridazin-Biotin, immobilisiert an Streptavidin-gekoppelten Mikrotiterplatten.** In der ersten Selektionsrunde wurden  $10^{12}$  scFv-Phagen der ETH-2 Bank zur Selektion eingesetzt. In der zweiten Runde wurden  $10^{11}$ , in allen weiteren  $10^{10}$  scFv-Phagen, amplifiziert aus der jeweiligen Selektionsrunde verwendet. Angegeben sind die Phagentiter in Kolonie-bildenden Einheiten („colony forming units“, cfu) für die Elution nach der Präselektion und die saure Elution mit Glycin HCl pH 2,8 sowie bei den ersten beiden Selektionsrunden für den letzten Waschschrift vor den Elutionen

**Tab. 3.5 Absolute Werte der Titerbestimmungen (Selektion an SMP-Biotin). Angaben in cfu**

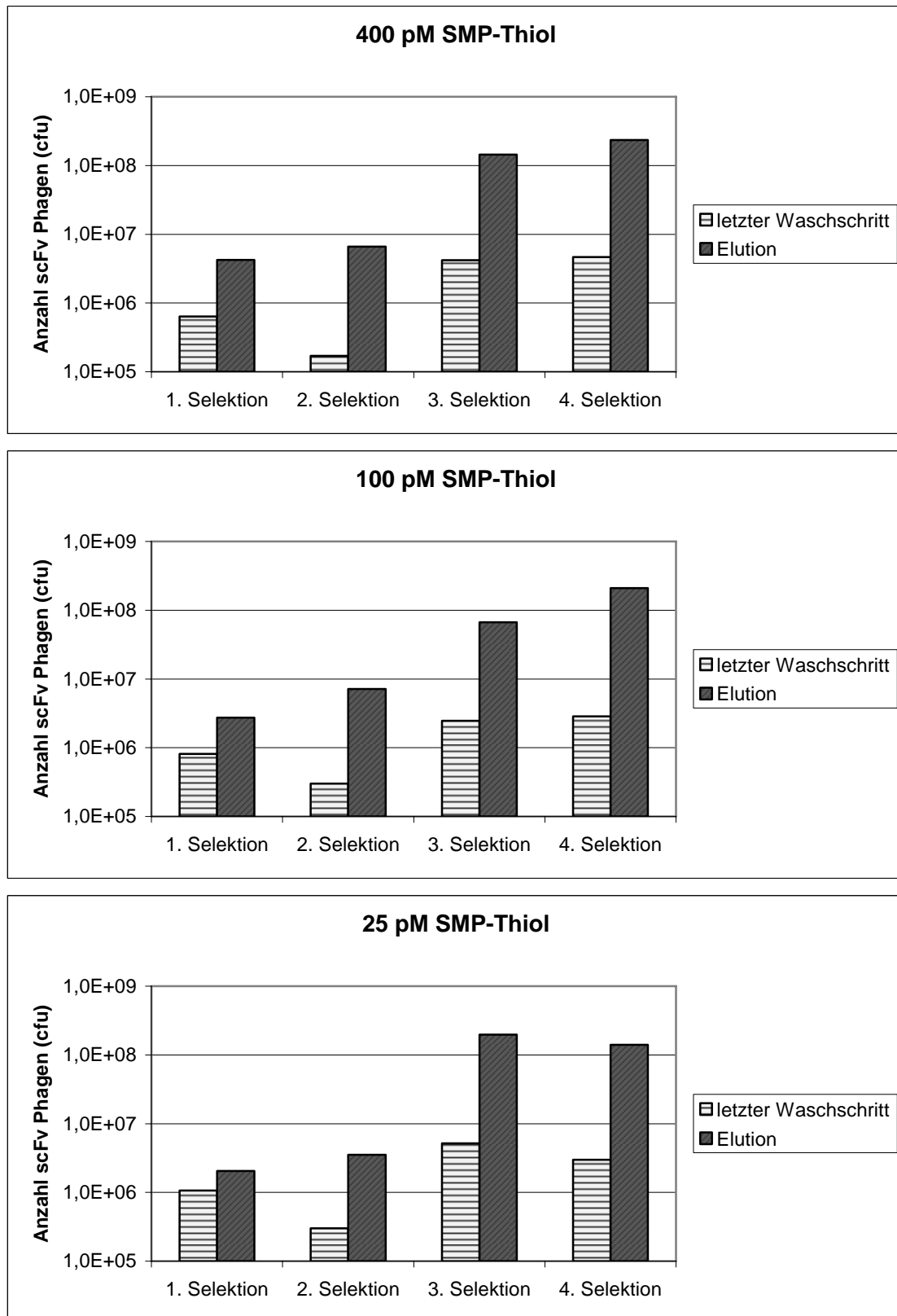
	1. Selektion	2. Selektion	3. Selektion	4. Selektion
Letzter Waschschrift	$6,6 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$	nb	nb
ElutionPräselektion	$4,9 \times 10^6$	$2,3 \times 10^7$	$5,96 \times 10^7$	$2,2 \times 10^6$
Elution Probe	$2,8 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$	$6 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$

### 3.3.5 Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an Maleimid-aktivierten Mikrotiterplatten (SMP-Thiol Konjugat)

Zur Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen mithilfe des SMP-Thiol Derivats wurde dieses an Maleimid-aktivierte Mikrotiterplatten immobilisiert. Der Ligand wurde in drei verschiedenen Konzentrationen (400, 100 und 25 pM/Vertiefung) eingesetzt und für jede dieser Konzentrationen wurde ein eigener Selektionszyklus durchgeführt. Vor jeder Selektionsrunde wurde eine Präselektion an abgesättigten Mikrotiterplatten durchgeführt (2.4.11). In der ersten Selektionsrunde wurden  $1 \times 10^{12}$  scFv-Phagen aus der ETH-2 Bank eingesetzt, in der zweiten Selektionsrunde wurden  $1 \times 10^{11}$  in allen weiteren Runden wieder  $1 \times 10^{12}$  amplifizierte scFv-Phagen verwendet. Nach Bindung der Phagen an das Antigen wurde 15 mal gewaschen (2.4.11) und die Elution erfolgte mit Glycin HCl pH 2,8.

Ausgenommen für den Zyklus 25 pM SMP-Thiol, war ein kontinuierlicher Anstieg der Eluat-Phagentiter über die vier Selektionsrunden zu beobachten (Abb. 3.8, Tab. 3.6). Die Phagentiter für den letzten Waschschrift waren insgesamt deutlich niedriger als die der Eluate. Auch sanken sie in der zweiten Runde stark, für den Zyklus 25 pM SMP-Thiol konnte auch in der vierten Selektionsrunde eine Reduktion dieses Phagentiters beobachtet werden. In den beiden übrigen Zyklen stieg der Phagentiter des letzten Waschschriffs von der dritten zur vierten Selektionsrunde nur sehr schwach an.





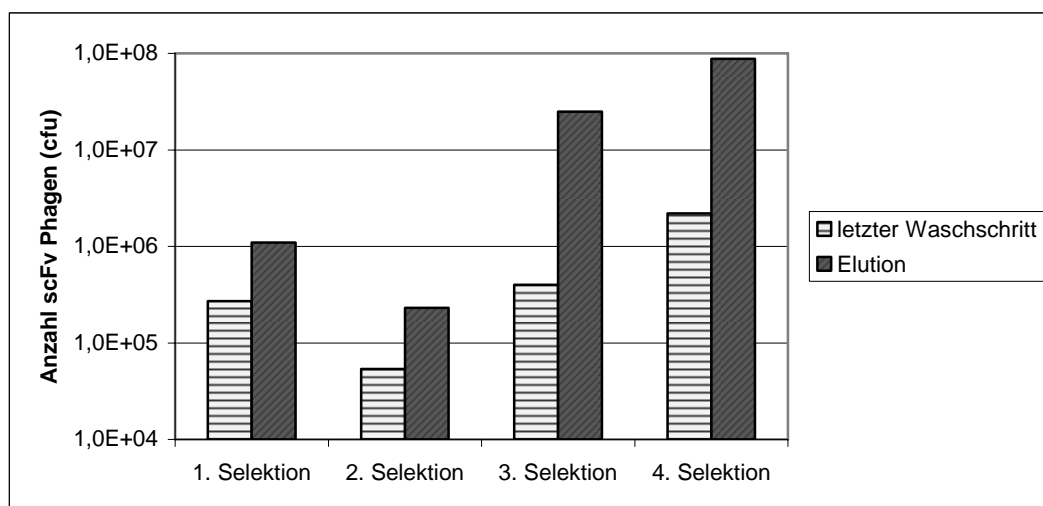
**Abb. 3.8 Vier Selektionsrunden an Sulfamethoxypyridazin-Thiol (400, 100 und 25 pM), immobilisiert an Maleimid-aktivierten Mikrotiterplatten.** In der ersten Selektionsrunde wurden jeweils  $10^{12}$  scFv-Phagen der ETH-2 Bank zur Selektion eingesetzt. In der zweiten Runde wurden je  $10^{11}$ , in allen weiteren  $10^{12}$  scFv-Phagen, amplifiziert aus den jeweiligen Selektionsrunden verwendet. Angegeben sind die Phagentiter in Kolonie-bildenden Einheiten („colony forming units“, cfu) für den letzten Waschschrift und die saure Elution mit Glycin HCl pH 2,8.

**Tab. 3.6 Absolute Werte der Titerbestimmungen (Selektion an SMP-Thiol). Angaben in cfu**

	1. Selektion	2. Selektion	3. Selektion	4. Selektion
letzter Waschschrift <b>400</b>	$6,35 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$4,21 \times 10^6$	$4,64 \times 10^6$
Elution <b>400</b>	$4,25 \times 10^6$	$6,58 \times 10^6$	$1,44 \times 10^8$	$2,34 \times 10^8$
letzter Waschschrift <b>100</b>	$8,1 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	$2,46 \times 10^6$	$2,85 \times 10^6$
Elution <b>100</b>	$2,73 \times 10^6$	$7,17 \times 10^6$	$6,7 \times 10^7$	$2,1 \times 10^8$
letzter Waschschrift <b>25</b>	$1,07 \times 10^6$	$3 \times 10^5$	$5,18 \times 10^6$	$2,98 \times 10^6$
Elution <b>25</b>	$2,05 \times 10^6$	$3,53 \times 10^6$	$1,98 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$

### 3.3.6 Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an Maleimid-aktivierten Mikrotiterplatten (SMP-VBlink Konjugat)

Die Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen mithilfe des SMP-VBlink Konjugates erfolgte wie unter 2.4.11 und 3.3.5 beschrieben. Präselektionen wurden nur in den ersten beiden Selektionsrunden durchgeführt. In der ersten Selektionsrunde wurden  $1 \times 10^{12}$  scFv-Phagen aus der ETH-2 Bank in allen weiteren Runden  $1 \times 10^{11}$  amplifizierte Phagen eingesetzt.



**Abb. 3.9 Vier Selektionsrunden an SMP-VBlink, immobilisiert an Maleimid-aktivierten Mikrotiterplatten.** In der ersten Selektionsrunde wurden  $10^{12}$  scFv-Phagen der ETH-2 Bank zur Selektion eingesetzt. In allen weiteren Runden wurden  $10^{11}$  scFv-Phagen, amplifiziert aus der jeweiligen Selektionsrunde verwendet. Angegeben sind die Phagentiter in Kolonie-bildenden Einheiten („colony forming units“, cfu) für den letzten Waschschrift und die saure Elution mit Glycin HCl pH 2,8.

**Tab. 3.7 Absolute Werte der Titerbestimmungen (Selektion an SMP-VBlink). Angaben in cfu**

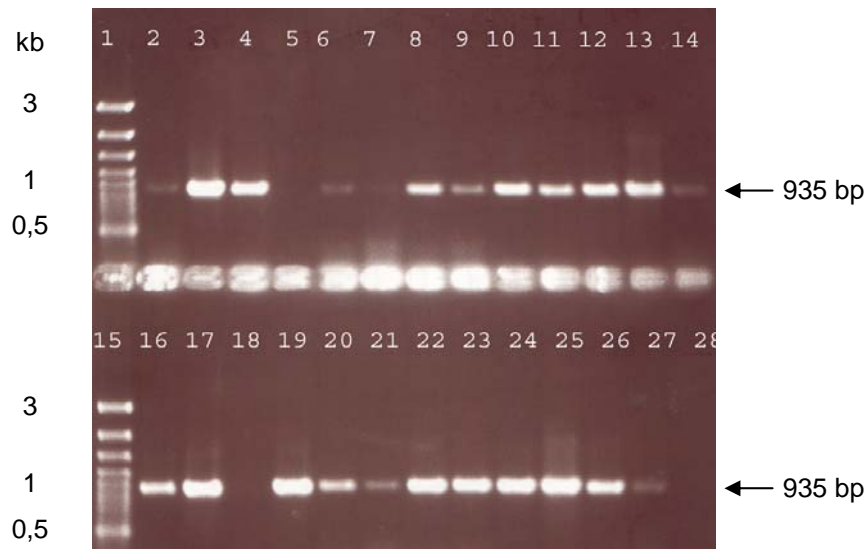
	1. Selektion	2. Selektion	3. Selektion	4. Selektion
letzter Waschschrift	$2,7 \times 10^5$	$5,37 \times 10^4$	$4 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$
Elution	$1,1 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$	$2,5 \times 10^7$	$8,8 \times 10^7$

Es zeigte sich nach einem Absinken der Phagentiter in der zweiten Selektionsrunde ein kontinuierlicher Anstieg der Titer im Verlauf der folgenden Selektionsrunden. Dieser Anstieg war bei den Eluatn sehr viel ausgeprägter, als bei den Proben der letzten Waschschriffe.

### 3.4 Analyse der selektierten scFv-Klone

#### 3.4.1 PCR-Analyse selektierter scFv-Klone

Im Anschluss an die Selektion antigenspezifischer scFv-Phagen (3.3) wurden die resultierenden Klone mittels Kolonie-PCR (2.2.11) auf Vorhandensein vollständiger scFv Gene untersucht. Dazu wurde eine definierte Anzahl Kolonien (Tab 3.8) aus der Elution der letzten Selektionsrunde in einer Kolonie-PCR mit den Primern LMB3 und fdSeq eingesetzt. Ein vollständiges scFv Gen ergibt dabei ein PCR-Fragment von 935 bp. In Abbildung 3.10 ist beispielhaft das Ergebnis einer Kolonie-PCR aus der Selektion gegen 100 pM SMP-Thiol abgebildet.



**Abb. 3.10 Kontrolle von selektierten scFv-Klonen auf Vollständigkeit der Antikörperfragmente.** Dargestellt ist das Ergebnis einer Kolonie-PCR, die zur Kontrolle selektierter scFv-Klone auf Vollständigkeit der Antikörperfragmente durchgeführt wurde. In vorliegendem Beispiel stammen die Klone aus der Selektion gegen 100 pM SMP-Thiol an Maleimid-aktivierten Mikrotiterplatten (3.3.5). Ein vollständiges scFv-Gen ergibt durch Amplifikation mit den Primern LMB3 und fdSeq ein PCR-Fragment von 935 bp. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in 1 % Agarose-Gelen bei 90 V für 45 min. In Bahn 1 und 15 sind je 5 µl der 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas) aufgetragen. Bahn 2 bis 27 zeigen die PCR-Produkte der Klone 1 bis 25 aus der oben genannten Selektion, Bahn 28 die Negativkontrolle (je 10 µl + 2 µl Loading Dye Solution). 23 der 25 scFv-Klone ergaben ein PCR-Produkt der erwarteten Fragmentgröße.

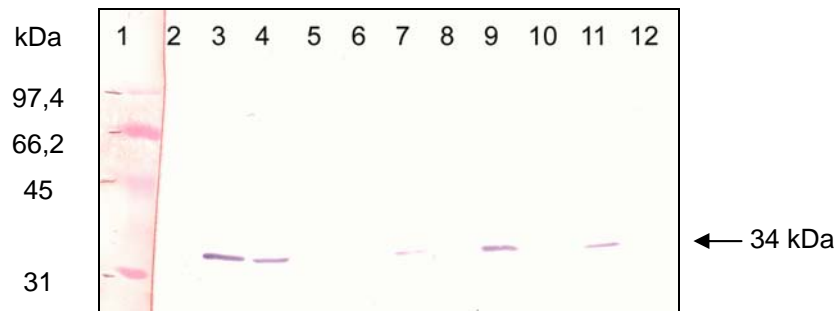
In Tabelle 3.8 sind die Ergebnisse sämtlicher Kolonie-PCRs für die einzelnen Selektionszyklen in numerischer Form aufgeführt. Die Klone, welche aus der Selektion an dem SMP-VBlink Konjugat hervorgingen, sind hier nicht aufgeführt, da diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit direkt einer Expressions- und Sequenz-Analyse unterworfen wurden.

**Tab. 3.8 Analyse selektierter scFv-Klone auf Vollständigkeit der scFv-Gene.** Nach erfolgter Selektion auf Antigen-spezifische scFv-Phagen wurden ausgewählte Klone mittels Kolonie-PCR auf Vollständigkeit ihrer scFv-Gene untersucht. Die unten stehende Tabelle führt bezüglich der einzelnen Selektionsmethoden und Liganden die absoluten Werte für die Anzahl PCR-analyasierter scFv-Klone (K-PCR) sowie die ermittelte Anzahl der Klone mit vollständigem scFv-Gen ( $V_H + V_L$ ) auf. Des Weiteren ist der prozentuale Anteil vollständiger scFv-Klone an der Gruppe der PCR-analysierten scFv-Klone aufgeführt (%  $V_H + V_L$ ).

Selektionsmethode	scFv-Bank	Ligand	K-PCR	$V_H + V_L$	% $V_H + V_L$
Magnetic beads	Griffin. 1	SMP	32	5	15,6 %
Magnetic beads	ETH-2	SMP	51	43	84,3 %
Streptavidin Mikrotiterplatten	ETH-2	SA-Biotin	100	74	74 %
Streptavidin Mikrotiterplatten	ETH-2	SMP-Biotin	100	22	22 %
Maleimid-aktivierte Mikrotiterplatten	ETH-2	SMP-Thiol 400 pM	100	99	99 %
Maleimid-aktivierte Mikrotiterplatten	ETH-2	SMP-Thiol 100 pM	100	94	94 %
Maleimid-aktivierte Mikrotiterplatten	ETH-2	SMP-Thiol 25 pM	100	98	98 %
Maleimid-aktivierte Mikrotiterplatten	ETH-2	SMP- Vblink	nb	nb	nb

### 3.4.2 Expressions-Analyse selektierter scFv-Klone

ScFv-Klone mit vollständigem scFv-Gen (3.4.1) wurden anschließend einer Expressions-Analyse unterworfen, in der untersucht wurde, ob die entsprechenden Gene exprimierbar waren. Dieses wurde entweder über einen Expressionstest in 5 ml Expressionskulturen, anschließender SDS-PAA-Gelelektrophorese der Kulturüberstände sowie Western Blot und Immunfärbung (2.4.15) oder mit Hilfe der Deoxycholat (DOC)-Methode (2.4.16) durchgeführt. Abbildung 3.11 stellt beispielhaft das Ergebnis eines Expressionstests für die SA-Biotin scFv-Klone 55 bis 62 dar.



**Abb. 3.11 Test auf exprimierbare scFv-Klone.** Vollständige scFv-Klone wurden in *E. coli* TB1 transformiert. 5 ml Expressionskulturen wurden bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,8 angezogen und anschließend unter Zugabe von 0,5 mM IPTG ÜN bei 30 °C und 220 Upm induziert. Je 15 µl Kulturüberstand wurden in 1 x SSB SDS-PAA-gelelektrophoretisch aufgetrennt, die Proteine wurden anschließend über Western Blots auf Nitrocellulose transferiert und es wurden Immunfärbungen mit dem „ANTI-FLAG® M2 Monoclonal Antibody“ als primären und dem „Goat Anti-Mouse IgG (whole molecule) Alkaline Phosphatase Conjugate“ (Sigma-Aldrich) als sekundären Antikörper durchgeführt. Die Abb. zeigt das Ergebnis der Immunfärbung für die scFv-Klone SA-Bio K55 bis K62. In Bahn 1 wurden 10 µl des „Standard MWG Low Range“ (Biorad) Markers aufgetragen. Bahn 2 bis 9 enthalten die Proben der scFv-Klone SA-Bio K55 bis K62. In Bahn 10 wurde als Negativkontrolle Kulturüberstand von nicht-transformiertem *E. coli* TB1 in Bahn 11 als Positivkontrolle Kulturüberstand von TB1 BFB1-02 scFv (Lauer 2005) aufgetragen. Ein vollständiges scFv-Fragment ergibt als Fusionsprotein mit den Markierungen exprimiert eine Bande von 34 kDa.

Die angefärbte Bande bei etwa 34 kDa entspricht der eines vollständig und in Fusion mit den Markierungen (Phosphorylierungsstelle, FLAG-tag, 6x His-tag) exprimierten scFv-Fragmentes aus der ETH-2 Bibliothek. Tabelle 3.9 stellt die Ergebnisse sämtlicher Expressions-Analysen in numerischer Form dar.

**Tab. 3.9 Analyse vollständiger scFv-Klone auf Exprimierbarkeit des scFv Gens.** An die Analyse der scFv-Klone mittels Kolonie-PCR (Tab.3.8) schloss sich die Untersuchung dieser Klone auf Exprimierbarkeit ihrer scFv Gene an. Dieses erfolgte über einen klassischen Expressionstest (ET) oder mittels DOC-Methode (DOC). Die Tabelle führt bezüglich der einzelnen Selektionsmethoden und Liganden, sowie der Methode des durchgeführten Expressionstests (EM) die Anzahl der Vollängen-scFvs auf, die in die Expressionsanalyse eingingen (scFv). Des Weiteren ist die absolute Anzahl der exprimierbaren Klone (pos.) sowie deren prozentualer Anteil an der Gruppe der untersuchten Klone (% pos.) aufgeführt.

Selektionsmethode	scFv-Bank	Ligand	EM	scFv	pos.	% pos.
Magnetic beads	Griffin.1	SMP	ET	5	2	40 %
Magnetic beads	ETH-2	SMP	ET	43	3	7 %
Streptavidin Mikrotiterplatten	ETH-2	SA-Biotin	ET	74	19	25,7 %
Streptavidin Mikrotiterplatten	ETH-2	SMP-Biotin	ET	22	9	40,9 %
Maleimid-aktivierte Mikrotiterplatten	ETH-2	SMP-Thiol 400 pM	DOC	99	25	25,3 %
Maleimid-aktivierte Mikrotiterplatten	ETH-2	SMP-Thiol 100 pM	DOC	94	15	16 %
Maleimid-aktivierte Mikrotiterplatten	ETH-2	SMP-Thiol 25 pM	DOC	98	15	15,3 %
Maleimid-aktivierte Mikrotiterplatten	ETH-2	SMP-VBlink	DOC	- (100)	58	58 %

### 3.4.3 Sequenz-Analyse selektierter scFv-Klone

Eine ausgewählte Anzahl exprimierbarer scFv-Klone wurde im Anschluss an die Expressions-Analyse sequenziert. Klone, die aus der ETH-2 Bank hervorgingen, unterscheiden sich lediglich in der Sequenz ihrer CDR 3 Regionen. Durch die Sequenzierung sollte untersucht werden, ob im Verlauf der Selektion Klone identischer CDR L3 bzw. CDR H3 Sequenz angereichert wurden. Es zeigte sich, dass für die Selektionen an Streptavidin-gekoppelten Mikrotiterplatten sowie für die Selektion gegen das SMP-VBlink Derivat Klone mit identischer CDR H3 Sequenz angereichert werden konnten. In anderen

Fällen war die Variabilität der selektierten Klone erheblich höher. Tab. 3.10 zeigt die gesamten Ergebnisse im Überblick.

**Tab. 3.10 Sequenzierung von scFv-Klonen.** Nachdem die selektierten scFv-Klone mittels Kolonie-PCR (Tab 3.8) und Expressionsanalyse (Tab 3.9) untersucht worden waren, wurden ausgewählte Klone sequenziert. Die unten stehende Tabelle führt die Anzahl sequenzierter scFv-Klone auf, sowie die Anzahl derer, die eine identische CDR H3 Sequenz aufwiesen.

Selektionsmethode	scFv-Bank	Ligand	Sequenzierte Klone	CDR H3 identisch
Magnetic beads	Griffin.1	SMP	5	0
Magnetic beads	ETH-2	SMP	3	0
Streptavidin Mikrotiterplatten	ETH-2	SA-Biotin	16	2 + 2 + 3
Streptavidin Mikrotiterplatten	ETH-2	SMP-Biotin	9	9
Maleimid-aktivierte Mikrotiterplatten	ETH-2	SMP-Thiol 400 pM	10	0
Maleimid-aktivierte Mikrotiterplatten	ETH-2	SMP-Thiol 100 pM	10	0
Maleimid-aktivierte Mikrotiterplatten	ETH-2	SMP-Thiol 25 pM	10	0
Maleimid-aktivierte Mikrotiterplatten	ETH-2	SMP-VBlink	10	2 + 2

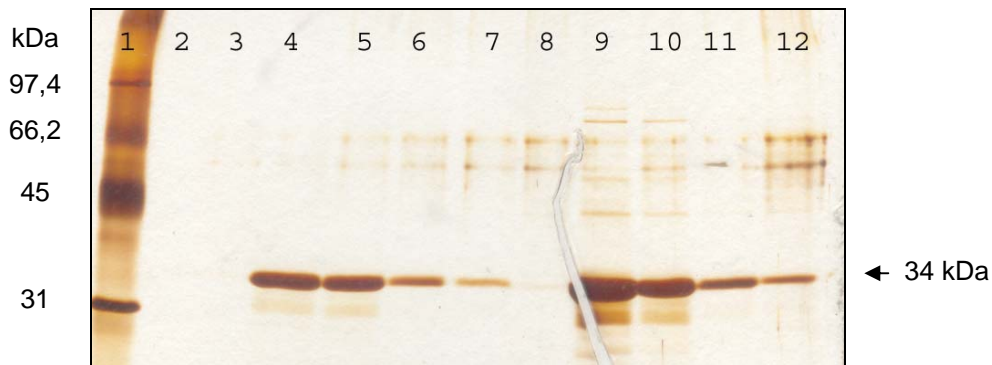
### 3.5. Expression und Aufreinigung von scFv-Fragmenten

Die Isolation von scFv-Fragmenten erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit entweder aus der periplasmatischen Proteinfraction von *E. coli* (3.5.1) oder aus dem Kulturüberstand von *E. coli* Expressionskulturen (3.5.2). Die Aufreinigung wurde in der Regel über Protein A-Affinitätschromatographie (2.3.5) durchgeführt.



### 3.5.1 Isolation von scFv-Fragmenten aus der periplasmatischen Proteinfraktion von *E. coli*

Die Isolation der periplasmatischen Proteinfraktion erfolgte aus 500 ml *E. coli* TB1 Expressionskulturen (2.3.2). Die beiden entstehenden Fraktionen PPP und OSP wurden bei pH 8,0 über Protein A-Affinitätschromatographie aufgereinigt (2.3.5). Die Eluate wurden zur Überprüfung der Reinheit SDS/PAA-gelelektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung 3.12 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Aufreinigung des SMP-ETH K1 scFvs aus der Selektion an SMP-gekoppelten SiMAG TCI beads. Ein vollständiges scFv-Fragment, (mit Markierungssequenzen) ergibt eine ca 34 kDa große Bande.



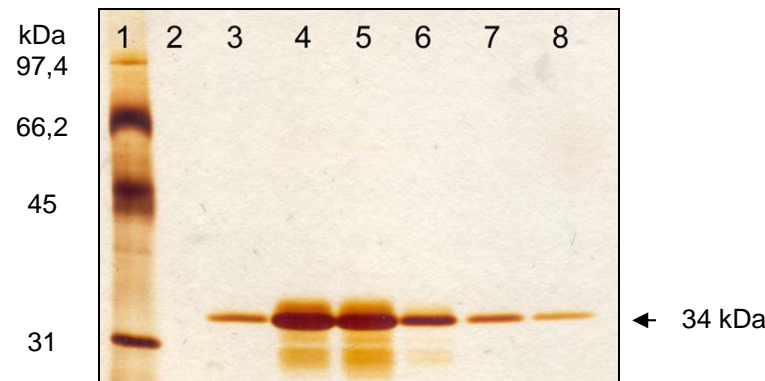
**Abb. 3.12 Isolation von rekombinantem scFv aus der periplasmatischen Proteinfraktion von *E. coli* TB1 und Aufreinigung über Protein A-Affinitätschromatographie. Ergebnis einer Silberfärbung.** SMP-ETH K1 scFv wurde in *E. coli* TB1 exprimiert und über die Präparation der periplasmatischen Proteinfraktion isoliert. Die dabei erhaltenen Fraktionen „periplasmatische Präparation“ (PPP) und „osmotische Schock Präparation“ (OSP) wurden getrennt über Protein A-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Eluate wurden in Fraktionen aufgefangen und jeweils 15 µl jeder Fraktion wurden in 1 x SSB gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dargestellt ist das Ergebnis einer Silberfärbung eines 12 % SDS/PAA-Gels. In Bahn 1 wurden 5 µl einer 1:100 Verdünnung des „Standard MWG Low Range“ (Biorad) aufgetragen. Bahn 3 bis 7 enthalten die Eluate 1 bis 5 der PPP, Bahn 8 bis 12 die Eluate 1 bis 5 der OSP.

Fraktionen größter Reinheit wurden vereinigt, aufkonzentriert und in den später zu verwendenden HBS-EP Puffer umgepuffert (2.3.6). Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt (2.3.7) und die für die Oberflächenplasmonresonanzanalyse benötigten Verdünnungen in HBS-EP Puffer hergestellt.

### 3.5.2 Isolation von scFv-Fragmenten aus dem Kulturüberstand von *E. coli* Expressionskulturen

200 ml Kulturüberstand von *E. coli* Expressionskulturen wurden bei pH 8,0 über Protein A-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Reinheit der Eluate wurde

SDS/PAA-gelelektrophoretisch überprüft. Abbildung 3.13 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Aufreinigung des SMP-Bio K49 scFvs aus der Selektion an SMP-Biotin. Ein mit den Markierungssequenzen fusioniertes scFv-Fragment ergibt im Gel eine ca. 34 kDa große Bande.



**Abb. 3.13 Isolation von rekombinantem scFv aus dem Kulturüberstand einer *E. coli* TB1 Expressionskultur und Aufreinigung über Protein A-Affinitätschromatographie. Ergebnis einer Silberfärbung.** SMP-Bio K49 scFv wurde in *E. coli* TB1 exprimiert. 200 ml Kulturüberstand wurden auf pH 8,0 eingestellt und über Protein A-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Eluate wurden in Fraktionen aufgefangen und jeweils 20 µl jeder Fraktion wurden in 1 x SSB gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dargestellt ist das Ergebnis einer Silberfärbung eines 12 % SDS/PAA-Gels. In Bahn 1 wurden 5 µl einer 1:100 Verdünnung des „Standard MWG Low Range“ (Biorad) aufgetragen. Bahn 3 bis 8 enthalten die Eluate 1 bis 6.

Auch hier wurden Fraktionen größter Reinheit vereinigt, aufkonzentriert und in den später zu verwendenden HBS-EP Puffer umgepuffert (2.3.6). Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt (2.3.7) und die für die Oberflächenplasmonresonanzanalyse benötigten Verdünnungen in HBS-EP Puffer hergestellt.

### 3.6. Analyse transformierter *N. tabacum* Pflanzen

Bereits vor ihrer weiteren Charakterisierung wurden zwei exprimierbare scFv-Fragmente (Tab. 3.9) aus der Selektion an SMP-gekoppelten SiMAG CI beads (3.3.1) über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *XbaI* in den binären Vektor pGIIMH35S (Hust, 2002) kloniert (Abb 3.14). Bei den scFv-Fragmenten handelte es sich um die Klone SMP-14 und SMP-19. Mit den resultierenden Konstrukten sollte ein geeignetes System für die *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation von Tabakpflanzen etabliert werden. Unten aufgeführte Ergebnisse, die aus der PCR-Analyse der primären Regenerate (3.6.1) sowie

einer nativen Proteinisolation (3.6.2) hervorgingen, sollten Aufschluss über die prinzipielle Eignung des Transformationssystems geben. Beide Konstrukte wurden für die *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation von *N. tabacum* eingesetzt (2.2.10). Die Regeneration der Transformanten erfolgte auf MSZ-Medium wobei unter Zugabe steigender Konzentrationen Phosphinotricin auf transformierte Pflanzenzellen selektiert wurde (2.2.10, Tab. 2.6).

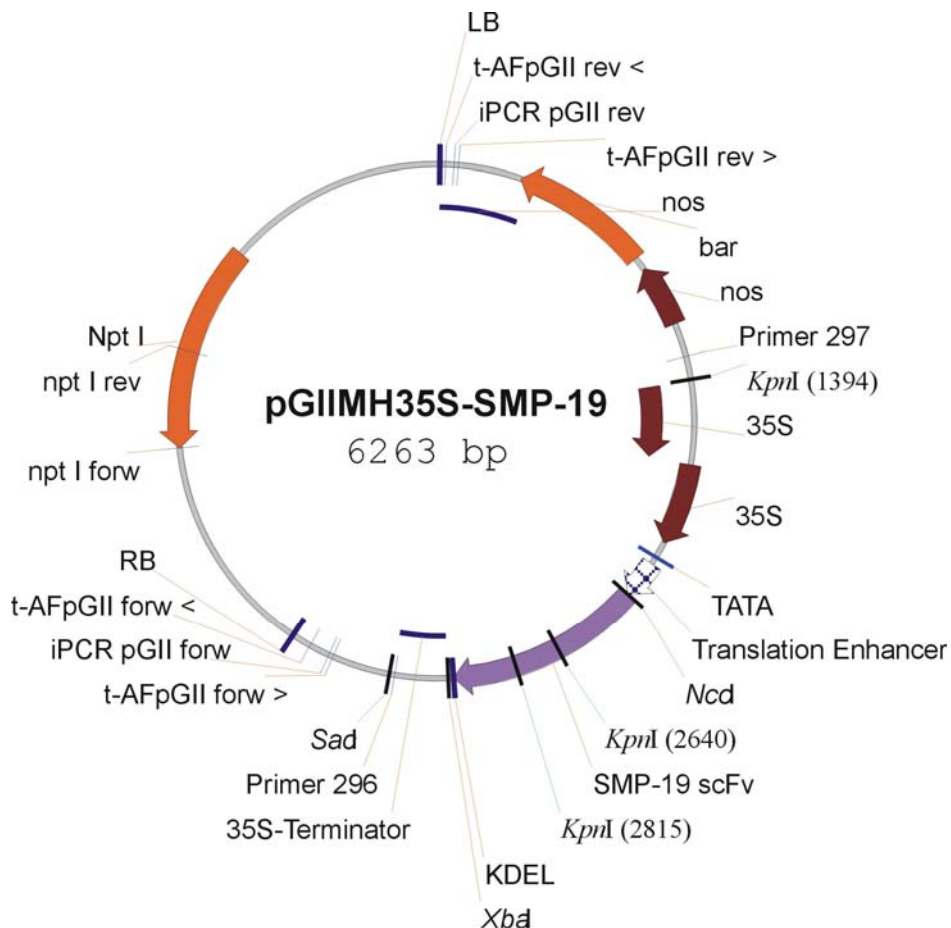
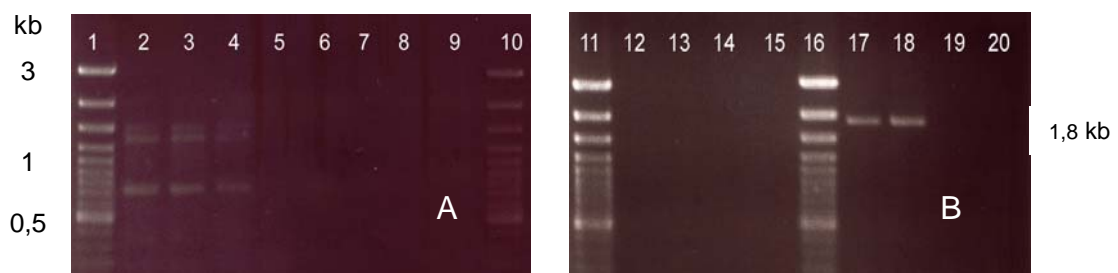


Abb. 3.14 pGIIMH35S mit SMP-19 scFv

### 3.6.1 PCR-Analyse transformierter *N. tabacum* Pflanzen

Aus den primären Regeneraten wurde mittels CTAB-Methode genomische DNA isoliert (2.2.11). Die Regenerate wurden zu diesem Zeitpunkt auf MSZ-Medium mit 10 µg/ml PPT (pGIIMH35S SMP-19 scFv) bzw. 5 µg/ml PPT (pGIIMH35S SMP-14 scFv) bei 24 °C und einem Tag/Nacht Rhythmus von 16/8h kultiviert. Zusätzlich wurde als Kontrolle genomische DNA aus *N. tabacum* var. Samsun isoliert. Die DNA wurde für Kontroll-PCRs mit jeweils vier Primerpaaren eingesetzt. Bei der ersten PCR handelte es sich um eine sog. inverse PCR (Primer: iPCR pGII for/ iPCR pGII rev), über die auf sog „backbone junctions“

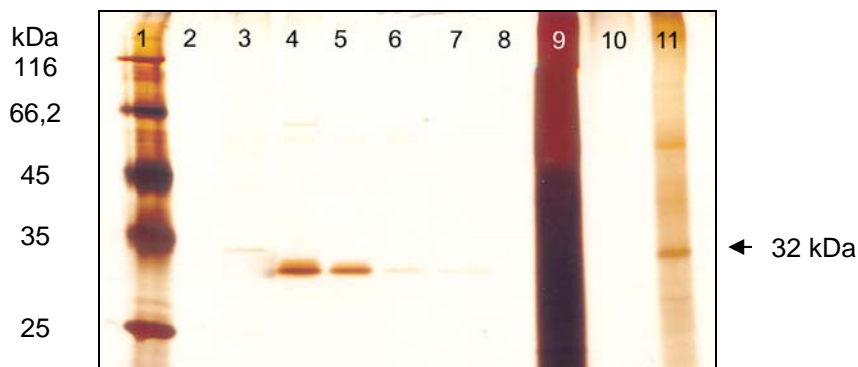
der T-DNA analysiert werden kann. Das Auftreten eines Amplifikats von etwa 3 kb deutet auf das Vorhandensein einer 2 x T-DNA Kopie in der genomischen DNA hin, das Auftreten größerer Fragmente auf entsprechend mehr Kopien. Diese PCR gibt einen ersten Aufschluss über die Anzahl integrierter Kopien des „gene of interest“ (Abb. 3.15 A, Bahn 2-4). In der zweiten hier durchgeführten PCR (Primer Npt I for 400/ Npt I rev 400) wird ein Teil des *nptI* Gens amplifiziert, welches die bakterielle Resistenz vermittelt. Ein 400 bp großes Amplifikat deutet auf das Vorhandensein von Agrobakterien in der Pflanze hin. Tritt hingegen kein Amplifikat auf, kann ein eventuelles positives Signal bezüglich des „gene of interest“ (s.u.) nicht auf noch in der Pflanze vorhandene Agrobakterien zurückzuführen sein (Abb. 3.15 A, Bahn 6-8). Auch mit der dritten PCR (Primer: pSoup for/ pSoup rev) analysiert man durch Amplifikation eines 411 bp Fragments aus dem Plasmid pSoup auf Vorhandensein von Agrobakterien im Regenerat. Auch hier deutet das Fehlen eines Amplifikats auf das nicht Vorhandensein von Agrobakterien hin (Abb. 3.15 B, Bahn 12-14). In der letzten PCR (Primer: MH Green f1/MH Terminator) wurde auf Vorhandensein des „gene of interest“ analysiert. Ein vollständiges scFv-Fragment ergibt durch Amplifikation mit den oben genannten Primern zusammen mit Signalsequenzen ein Amplifikat von rund 1850 bp (Abb. 3.15 B, Bahn 17-19).



**Abb 3.15 PCR-Analyse transformierter *N. tabacum* Pflanzen.** Nach *A. tumefaciens* vermittelter Transformation von *N. tabacum* Pflanzen mit den Konstrukten pGIIMH35S-SMP-14 und pGIIMH35S-SMP-19 wurde genomische DNA aus Blattmaterial isoliert und für Kontroll-PCRs eingesetzt. Die PCR-Analyse erfolgte für die beiden Transformanten sowie für eine nicht-transformierte Negativkontrolle (*N. tabacum* var. Samsun) jeweils mit den Primerpaaren iPCR pGII for/ iPCR pGII rev (A), Npt I for 400/ Npt I rev 400 (A), pSoup for/ pSoup rev (B) und MH Green f1/MH Terminator (B). Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer Agarose-Gelelektrophorese der resultierenden PCR-Produkte. Als Längenstandard wurden in Bahn 1, 10, 11 und 16 je 5 µl der „100 bp DNA Ladder Plus“ (MBI Fermentas) aufgetragen. Es wurden nachfolgend die PCR-Proben von SMP-14, SMP-19 und der Negativkontrolle aufgetragen. Bahn 2 bis 4 zeigt die Ergebnisse für die iPCR, Bahn 6 bis 8 die der *nptI* PCR (A). In Bahn 12 bis 14 wurden die Proben für die pSoup PCR aufgetragen, in Bahn 17 bis 19 die PCR-Produkte der PCR mit dem Primerpaar MH Green f1/MH Terminator (B).

### 3.6.2 Native Isolation von rekombinantem T-SMP-19 scFv aus transformierten *N. tabacum* Pflanzen

Um zu untersuchen, ob die transformierten Tabak Pflanzen rekombinanten scFv exprimieren, wurden sie weiter regeneriert und schließlich bis zur T<sub>1</sub> im Gewächshaus kultiviert. Blattmaterial der T<sub>1</sub> der SMP-19 scFv Linie 01/03 wurde für eine native Proteinisolation (2.3.3) verwendet. Der Protein-Rohextrakt wurde über Ni-NTA IMAC aufgereinigt und die Reinheit des Eluats wurde SDS/PAA-gelelektrophoretisch überprüft (Abb 3.16). Ein scFv-Fragment aus der Griffin.1 Bibliothek ergibt zusammen mit den Markierungen eine Bande von ca. 32 kDa.



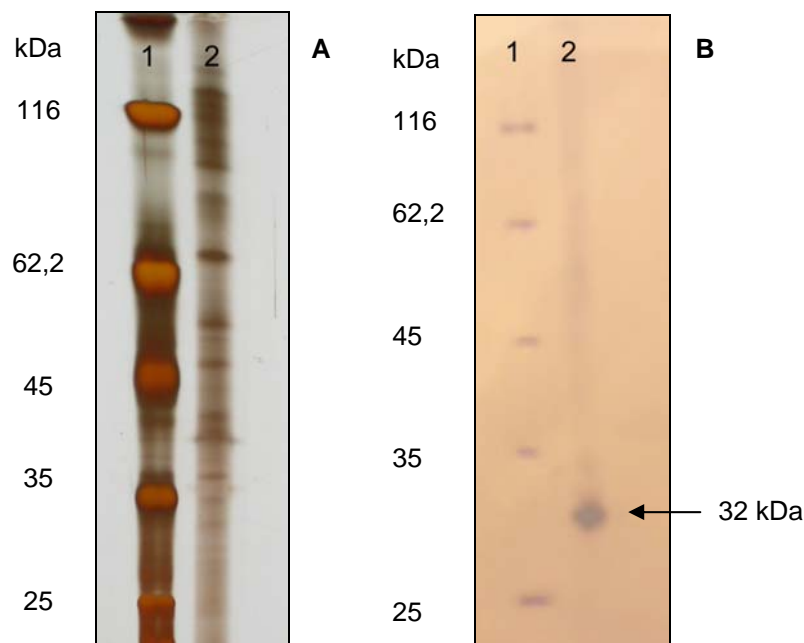
**Abb 3.16 Native Isolation von rekombinantem T-SMP-19 scFv aus transformierten *N. tabacum* Pflanzen. Ergebnis einer Silberfärbung.** Von 2,8 g Blattmaterial der T<sub>1</sub> transformierter *N. tabacum* Pflanzen (transformiert mit pGIIMH35S-SMP-19-Konstrukt) wurde eine native Proteinisolation (2.3.3) durchgeführt. Der entstehende Rohextrakt wurde über Ni-NTA IMAC aufgereinigt und das resultierende Eluat mithilfe einer „Amicon Ultra“ Zentrifugations-Filtereinheit (Millipore) aufkonzentriert. Alle Proben wurden in 1 x SSB gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dargestellt ist das Ergebnis einer Silberfärbung eines 12 % SDS/PAA-Gels. In Bahn 1 wurden 5 µl einer 1:100 Verdünnung des „Protein Molecular Weight Marker“ (MBI Fermentas) aufgetragen. Bahn 9 enthält 7,5 µl des Rohextraktes, Bahn 10 10 µl des Eluats nach Ni-NTA IMAC und Bahn 11 10 µl des aufkonzentrierten Eluats. In Bahn 3 bis 7 wurden zum Vergleich je 15 µl der Eluate 1 bis 5 einer Protein A-Aufreinigung des scFv-Klons SMP-VBlink 50 aufgetragen.

Anschließend wurde das Eluat aufkonzentriert und in den später zu verwendenden HBS-EP Puffer umgepuffert (2.3.6). Die Proteinkonzentration wurde bestimmt (2.3.7). Da der scFv weiter charakterisiert werden sollte, wurden die für die Oberflächenplasmonresonanzanalyse benötigten Verdünnungen in HBS-EP Puffer hergestellt.

### 3.6.3 Immunbiochemischer Nachweis des T-SMP-19 scFv

10 g homogenisiertes Blattmaterial der T<sub>1</sub> der SMP-19 scFv Linie 01/03 wurde erneut einer nativen Proteinisolation unterzogen und in zwei Schritten mit

Ammoniumsulfat gefällt. Das Präzipitat wurde über Ni-NTA-IMAC aufgereinigt und die Reinheit SDS/PAA-gelelektrophoretisch überprüft (Abb. 3.17 A). Zum Nachweis des rekombinanten T-SMP-19 scFv wurde eine Immunfärbung (Abb. 3.17 B) mit einem 1:1 Gemisch aus dem „His Tag (27E8) Monoclonal Antibody“ (NEB) und dem „Myc Tag (9B11) Mouse mAb“ (NEB) als primäre Antikörper durchgeführt. Als sekundärer Antikörper wurde der „Goat Anti-Mouse IgG (whole molecule) Alkaline Phosphatase Conjugate“ (Sigma-Aldrich) verwendet. Die in Abb. 3.17 B markierte Bande bei etwa 32 kDa stellt das rekombinante scFv-Fragment T-SMP-19 zusammen mit den Markierungssequenzen dar.



**Abb.3.17 Nachweis des rekombinanten SMP-19 scFv aus *N. tabacum*.** 10 g homogenisiertes Blattmaterial der T<sub>1</sub> transformierter *N. tabacum* Pflanzen der Linie 01/03 wurden einer nativen Proteinextraktion unterzogen. Der entstehende Rohextrakt wurde nachfolgend mit 20 % (w/v) und 60 % (w/v) Ammoniumsulfat gefällt und anschließend über Ni-NTA IMAC aufgereinigt. Das resultierende Eluat wurde in 1 x SSB in einem 12 % SDS/PAA-Gel aufgetrennt und anschließend wurde eine Silberfärbung (A) sowie ein Western Blot mit anschließender Immunfärbung (B) durchgeführt. In Bahn 1 wurden 5 µl einer 1:100 (A) bzw. 1:20 (B) Verdünnung des „Protein Molecular Weight Marker“ (MBI Fermentas) aufgetragen. Bahn 2 enthält jeweils 10 µl des aufgereinigten Eluats. Die Immunfärbung (B) wurde mit einem 1:1 Gemisch aus dem „His Tag (27E8) Monoclonal Antibody“ (NEB) und dem „Myc Tag (9B11) Mouse mAb“ (NEB) als primäre Antikörper durchgeführt. Als sekundärer Antikörper wurde der „Goat Anti-Mouse IgG (whole molecule) Alkaline Phosphatase Conjugate“ (Sigma-Aldrich) verwendet. Die Entwicklung der Immunfärbung erfolgte in einem NBT/BCIP Substratsystem. Die markierte Bande von ca. 32 kDa entspricht dem rekombinanten T-SMP-19 scFv.

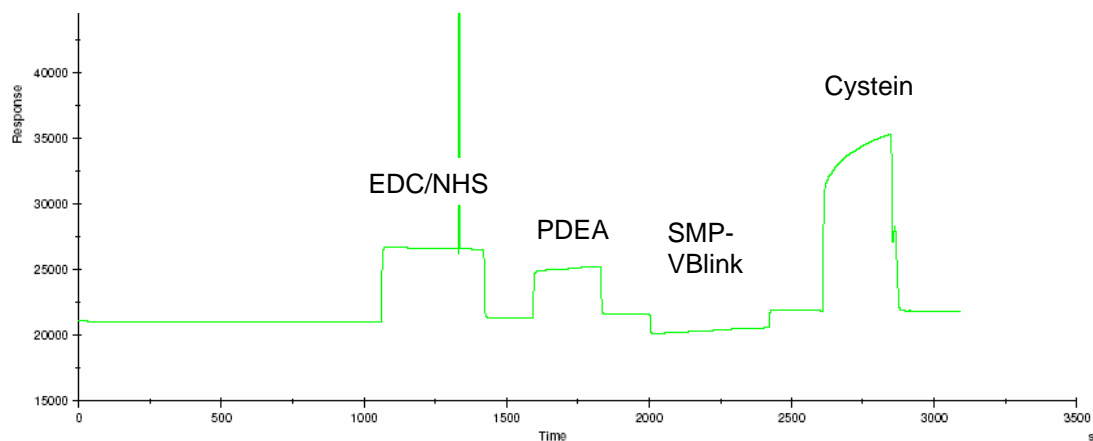


### 3.7 Charakterisierung der selektierten scFv-Fragmente

Die Charakterisierung der scFv-Fragmente, welche aus den unterschiedlichen Selektionen hervorgingen, erfolgte mittels Oberflächenplasmonresonanzanalyse (2.6.1). Dazu wurden die entsprechenden Klone auf einer Biacore 3000-Anlage hinsichtlich ihrer Affinität zum immobilisierten Antigen untersucht. Genauere Charakterisierungen erfolgten durch Konkurrenzexperimente mit freiem Antigen. Zunächst wurden solche Klone untersucht, die eine durch Sequenzierung nachgewiesene Identität der CDRH3 Sequenzen aufwiesen, anschließend weitere Klone, für die eine Sequenz vorlag (Tab 3.10). Die Untersuchungen der Klone, welche aus den Selektionen an Streptavidin-gekoppelten Mikrotiterplatten hervorgingen (3.3.3 und 3.3.4), erfolgte mithilfe von Streptavidin-beschichteten Sensor Chips SA (Biacore, Uppsala, Schweden) an denen SA-Biotin bzw. SMP-Biotin immobilisiert worden waren. Für die Untersuchung aller anderen Klone wurden CM5 Chips (Biacore, Uppsala, Schweden) verwendet, an denen die SH-Gruppen tragenden Linker-Moleküle SMP-Thiol bzw. SMP-VBlink immobilisiert worden waren. Für keinen der Klone, die aus den Selektionen an Streptavidin-gekoppelten Mikrotiterplatten hervorgingen, konnte ein spezifisches Bindungssignal für SA- bzw. SMP-Biotin erhalten werden. Eine vermutete Anreicherung sog. „interface binders“ (Tuomola *et al.* 2000), das heißt in vorliegendem Fall solcher Klone, die an Biotin oder Streptavidin binden, wurde mittels Biacore-Analysen an Streptavidin bzw. Streptavidin-Biotin gekoppelten Sensor-Chips untersucht, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Ebenso konnte für keinen der untersuchten Klone, welche aus den drei unterschiedlichen Selektionszyklen (400, 100 und 25 pM) an dem SMP-Thiol Konjugat hervorgingen (3.3.5) ein spezifisches Bindungssignal für SMP-Thiol erhalten werden. Hingegen konnte für den Klon SMP-ETH K1 scFv, welcher aus der Selektion an SMP-gekoppelten SiMAG TCI beads hervorging (3.3.2), ein positives Bindungssignal erhalten werden. Ebenso für den Klon SMP-VBlink 50 scFv aus der Selektion am Thiol-Linker Derivat SMP-VBlink (3.3.6). Des Weiteren konnten für den T-SMP-19 scFv, welcher aus transgenem Tabak isoliert wurde (3.6.2), Bindungsdaten aufgenommen werden. Für die genannten Klone werden die erhaltenen Bindungsdaten im Folgenden erläutert.

### 3.7.1 Ligand Thiol Immobilisierung SH-Gruppen tragender Liganden an einen CM5 Chip

Basis jeder Oberflächenplasmonresonanzanalyse ist eine geeignete Immobilisierung des Liganden an die Oberfläche des Sensor-Chips. Dieses erfolgte für die untenstehenden Experimente über eine sog. Ligand Thiol Immobilisierung der Linker-Moleküle SMP-Thiol bzw. SMP-VBlink (2.1.15) an die zweite Flusszelle eines CM5 Chips (2.6.2). Die erste Flusszelle des Chips wurde als Negativkontrolle aktiviert, derivatisiert und deaktiviert. Abbildung 3.18 zeigt das Sensorgramm, welches bei einer typischen Ligand Thiol Immobilisierung entsteht, hier dargestellt für das SMP-VBlink Molekül. Eine erfolgreiche Immobilisierung deutet sich in einem leichten Anstieg des Sensorgramms während der Injektion des Liganden an, wie er in untenstehender Abbildung zu beobachten ist. Der prominente „peak“, welcher während der Injektion des EDC/NHS Gemisches auftrat, ist auf dabei häufig entstehende Luftbläschen zurückzuführen.

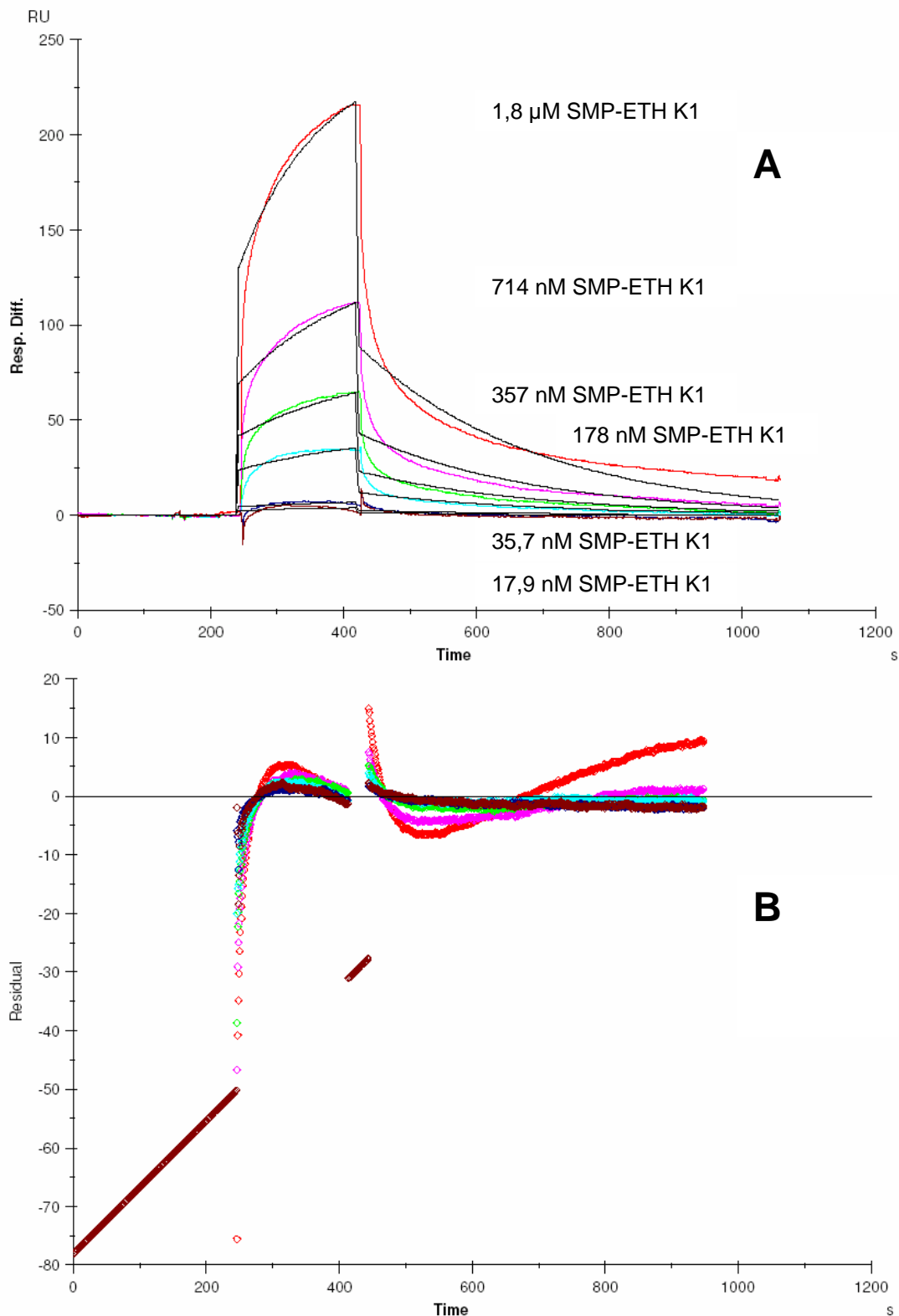


**Abb. 3.18 Ligand Thiol Immobilisierung an CM5 Chip.** Dargestellt ist der Verlauf eines Sensorgramms für die Ligand Thiol Immobilisierung eines SH-Gruppen tragenden Liganden (SMP-VBlink) an die zweite Flusszelle eines CM5 Chips. Die Immobilisierung erfolgte bei einer Flussrate von 5 µl/min. Nachfolgend wurde ein EDC/NHS 1:1 Gemisch, PDEA in Na-Borat pH 8,5, der Ligand in Na-Acetat pH 4,0 und für die finale Absättigung freier Bindestellen Cystein-NaCl injiziert.



### 3.7.2 Affinitätsbestimmung des SMP-ETH K1 scFv

Die Bestimmung der Affinität des scFv SMP-ETH K1 erfolgte an einem CM5 Chip, dessen zweite Flusszelle mit dem SMP-Thiol Konjugat der Firma Graffinity Pharmaceutical Design (Heidelberg) derivatisiert wurde. Die erste Flusszelle wurde als Negativkontrolle lediglich aktiviert, mit PDEA derivatisiert und anschließend mit Cystein deaktiviert. Der aufgereinigte scFv SMP-ETH K1 wurde in abnehmenden Konzentrationen (1,8  $\mu$ M, 714, 357, 178, 35,7, 17,9 nM) zunächst über die erste dann über die zweite Flusszelle geleitet (2.6.3). Das Signal der Flusszelle 1 wurde von dem der Flusszelle zwei abgezogen, um Effekte unspezifischer Bindungen an der Sensor-Chip Oberfläche aus dem Ergebnis zu eliminieren. Das resultierende Referenz-subtrahierte Sensorgramm ist in Abbildung 3.19 A dargestellt.



**Abb. 3.19 Bestimmung der Affinität des SMP-ETH K1 scFv für das SMP-Thiol Konjugat.** Es wurde eine kinetische Messung des Bindungsverhaltens verschiedener Konzentrationen des SMP-ETH K1 scFvs gegenüber dem an ein CM5 Chip immobilisierten SMP-Thiol Liganden durchgeführt. Die erhaltenen Messdaten wurden mithilfe der BIA Evaluation Software Version 4.1 unter Verwendung des 1:1 Langmuir Bindungsmodells analysiert (A). Des Weiteren ist der „residual plot“ für die Assoziations- und Dissoziationsphase dargestellt (B), der sich aus den Unterschieden zwischen den experimentellen und den analysierten Daten (fit, A) berechnet.

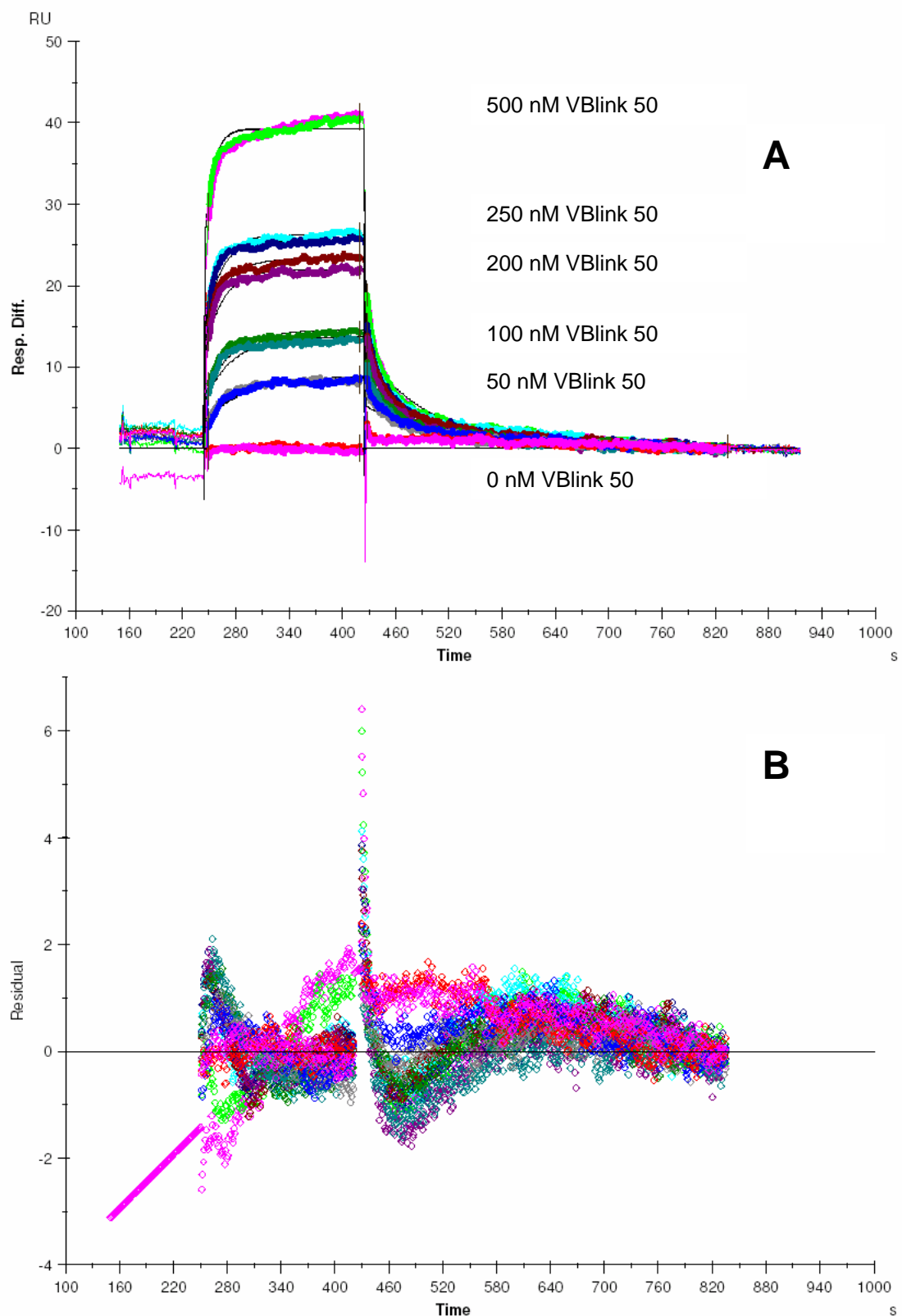
Zeit- und Signalachsen wurden normalisiert und die Kurven nach den Programmstandards der BIA Evaluation Software Version 4.1 der Firma Biacore AB (Uppsala, Schweden) „gefitted“.

Die Messung mit einer Konzentration von 1,8  $\mu\text{M}$  scFv ergab eine von 0 auf gut 200 RU ansteigende Kurve (Bindung des Antikörperfragments an das Antigen), die nicht ins Gleichgewicht gelangte. Ein Gleichgewichtszustand (die Anzahl der assoziierenden Fragmente ist gleich der Anzahl der dissoziierenden Fragmente) wurde hier nur für die deutlich niedrigere scFv Konzentration von 178 nM erreicht. Für die beiden niedrigsten scFv Konzentrationen konnte kein Bindungssignal mehr erhalten werden. Mit dem Ende der Injektion, setzt der kontinuierliche Pufferstrom über die Chip-Oberfläche wieder ein, die Kurven fallen stark ab und die Dissoziationsphase beginnt. Je affiner das Antikörperfragment ist, desto länger verbleibt es am Antigen und desto flacher verlaufen die Kurven in der Dissoziationsphase. Die erhaltenen Messwerte wurden mithilfe der BIA Evaluation Software Version 4.1 der Firma Biacore AB (Uppsala, Schweden) und unter Annahme eines Bindungsverhältnisses von Antigen zu Antikörper von 1:1 (1:1 Langmuir Bindungsmodell) analysiert. Die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) wurde nach den Programmstandards berechnet und ergab einen Wert von  $1,5 \times 10^{-6}$  M. Die Abbildung 3.19 B zeigt den „residual plot“ für die Assoziations- und Dissoziationsphase. Dieser berechnet sich aus den Unterschieden zwischen den experimentellen und den, nach mathematischer Anpassung der Messdaten durch numerische Integration, analysierten Daten.

Zur genaueren Charakterisierung des Antikörperfragmentes sollte untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß der scFv an den freien, nicht-konjugierten Liganden bindet. Dazu wurden Konkurrenzexperimente mit freiem Sulfamethoxypyridazin durchgeführt (2.6.3), in denen dieses in verschiedenen Konzentrationen dem Antikörper zugesetzt wurde, so dass es mit dem am Chip immobilisierten Antigen um die Bindungsstellen des scFvs konkurriert. Erkennt und bindet das Antikörperfragment das freie Antigen, so sollten mit dessen zunehmender Konzentration immer weniger Fragmente an den Chip binden. Die Sensorgramme sollten also mit zunehmender Konzentration des freien Antigens flacher verlaufen. Für den SMP-ETH K1 scFv konnte keine Konkurrenz des Antikörpers durch freies SMP erreicht werden.

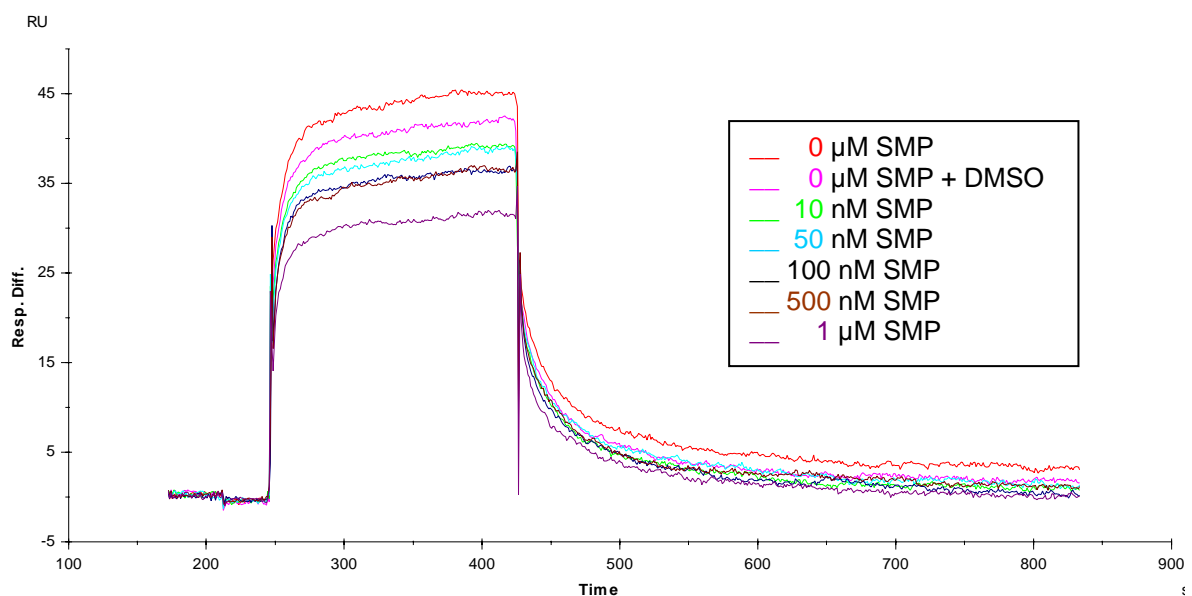
### 3.7.3 Affinitätsbestimmung des SMP-VBlink 50 scFv

Die Bestimmung der Affinität des scFv SMP-VBlink 50 erfolgte an einem CM5 Chip, dessen zweite Flusszelle mit dem SMP-VBlink Konjugat der Firma Kadem Custom Chem (Göttingen) derivatisiert war. Die erste Flusszelle wurde auch hier als Negativkontrolle (s.o) verwendet. Das aufgereinigte scFv-Fragment wurde in den Konzentrationen 500, 250, 200, 100, 50 und 0 nM injiziert. Die Referenz-subtrahierten, normalisierten und „gefitteten“ Sensorgramme zeigten zu Beginn der Injektion einen starken Anstieg (im Fall der scFv Konzentration 500 nM von 0 auf etwa 40 RU) und gelangten schnell ins Gleichgewicht (Abb. 3.20 A). Auch hier wurden die erhaltenen Messwerte unter Zuhilfenahme der BIA Evaluation Software Version 4.1 der Firma Biacore AB (Uppsala, Schweden) und unter Annahme eines Bindungsverhältnisses von Antigen zu Antikörper von 1:1 (1:1 Langmuir Bindungsmodell) analysiert. Die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) wurde mit den Programmstandards berechnet und ergab einen Wert von  $7,74 \times 10^{-8}$  M.



**Abb 3.20 Bestimmung der Affinität des SMP-VBlink 50 scFv für das SMP-VBlink Konjugat.** Dazu wurde eine kinetische Messung des Bindungsverhaltens verschiedener Konzentrationen des SMP-VBlink 50 scFvs gegenüber dem an ein CM5 Chip immobilisierten SMP-VBlink Liganden durchgeführt. Die erhaltenen Messdaten wurden mithilfe der BIA Evaluation Software Version 4.1 unter Verwendung des 1:1 Langmuir Bindungsmodells analysiert (A). Des Weiteren ist der zugehörige „residual plot“ für die Assoziations- und Dissoziationsphase dargestellt (B).

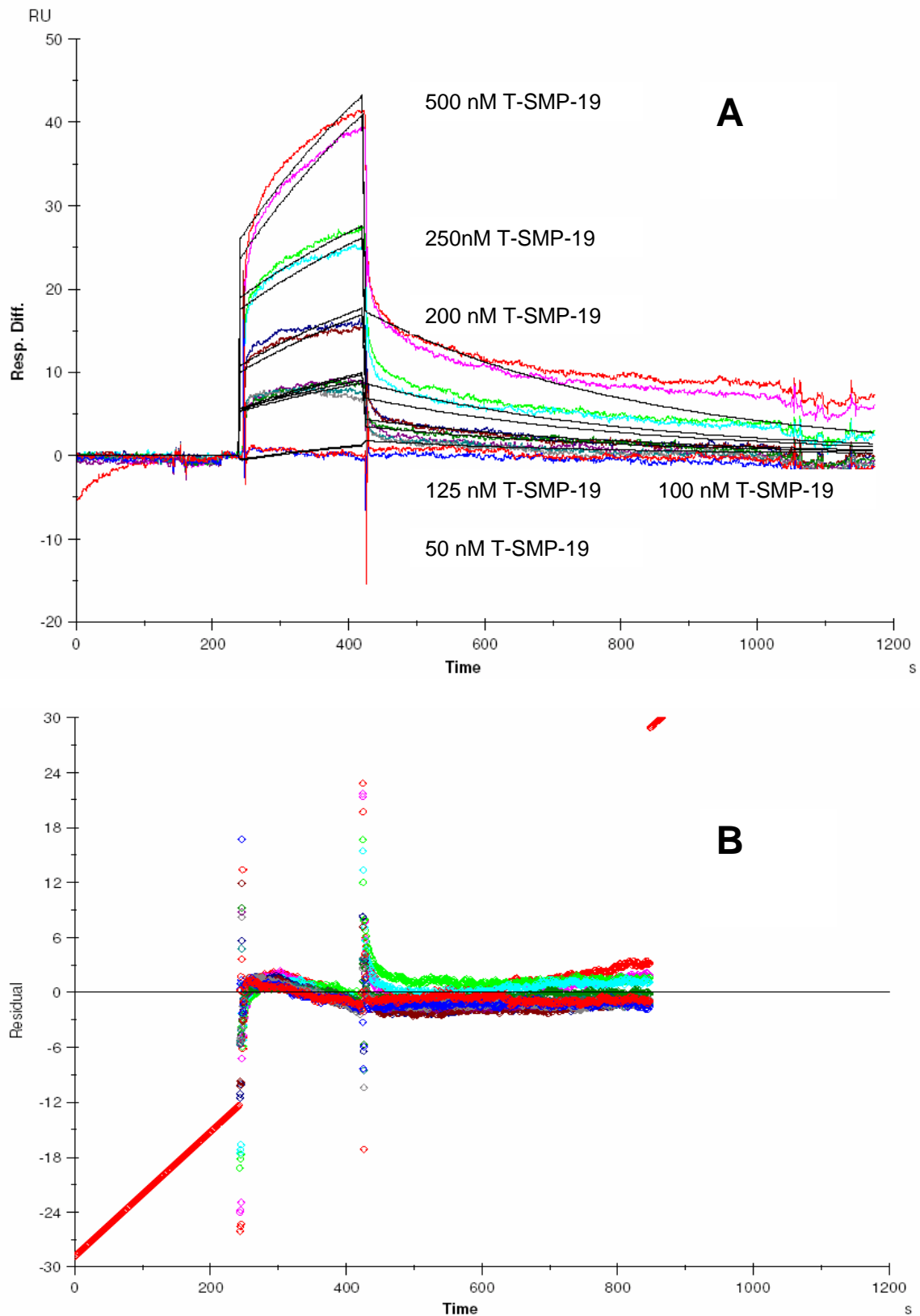
Auch hier wurden zur genaueren Charakterisierung des Antikörperfragmentes Konkurrenzexperimente mit freiem Sulfamethoxypyridazin durchgeführt (2.6.3 und 3.6.2). Dazu wurden jeweils 500 nM des scFv SMP-VBlink 50 mit SMP Konzentrationen von 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM und 1  $\mu$ M für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle diente dieselbe Menge scFv einmal ohne und einmal mit Zugabe von 0,04 % (v/v) DMSO. Die Proben wurden anschließend wie bereits beschrieben injiziert (2.7.3). Ohne Zugabe von freiem SMP, erreichte das Sensorgramm einen Maximalwert von ca. 45 RU (Abb. 3.21), was in etwa dem in der kinetischen Messung (Abb. 3.20 A) für diese Konzentration (500 nM) erhaltenen Wert entspricht. Die Zugabe von 0,04 % (v/v) DMSO führte zu einer leichten Reduktion dieses Maximalwertes. Mit zunehmender SMP Konzentration verliefen die Sensorgramme immer flacher, bei der Zugabe von 1  $\mu$ M ( $10^{-6}$  M) wurde noch ein Signal von etwa 30 RU erhalten (Abb. 3.21).



**Abb. 3.21 Konkurrenz von SMP-VBlink 50 scFv mit freiem Sulfamethoxypyridazin (SMP).** Für das Konkurrenzexperiment wurden jeweils 500 nM SMP-VBlink 50 scFv für eine halbe Stunde bei RT mit unterschiedlichen SMP Konzentrationen inkubiert. Die SMP-Lösungen enthielten alle eine einheitliche DMSO-Konzentration von 0,04 % (v/v). Als Kontrolle diente die genannte Menge SMP-VBlink 50 scFv einerseits ohne Zusatz von SMP (0  $\mu$ M SMP) sowie andererseits mit Zusatz von 0,04 % (v/v) DMSO (0  $\mu$ M SMP + DMSO). Nach der Inkubation erfolgte die Injektion der Proben über einen SMP-VBlink gekoppelten CM5 Chip bei einer Flussrate von 20  $\mu$ l/min. Dargestellt sind die Verläufe der resultierenden Sensorgramme.

#### 3.7.4 Affinitätsbestimmung des T-SMP-19 scFv

Zur Bestimmung der Affinität wurde derselbe CM5 Chip wie in 3.7.2 verwendet. Das aus Tabak aufgereinigte scFv-Fragment T-SMP-19 (3.6.2) wurde in den Konzentrationen 500, 250, 200, 125, 100 und 50 nM injiziert. Die Referenz-subtrahierten, normalisierten und „gefitteten“ Sensorgramme (Abb 3.22 A) zeigten zu Beginn der Injektion einen deutlichen Anstieg, gelangten aber für die oberen Konzentrationsbereiche nicht ins Gleichgewicht. Ein Gleichgewichtszustand wurde nur für die scFv Konzentrationen 125 nM und 100 nM erreicht. Die Sensorgramme verliefen hier etwa auf gleicher Höhe. Für die niedrigste scFv Konzentration von 50 nM konnte nahezu kein Bindungssignal mehr erhalten werden. Die Auswertung der Messwerte unter Annahme eines 1:1 Langmuir Bindungsmodells war hier nicht möglich. Als möglicher Grund wurde das Vorliegen eines heterogenen Gemisches aus Monomer- und Dimeranteilen des scFv-Fragmentes angenommen. Daher erfolgte die Auswertung der Messwerte unter Zuhilfenahme der BIA Evaluation Software Version 4.1 der Firma Biacore AB (Uppsala, Schweden) und unter Annahme eines „Heterogenous analyte (competing reactions)“ Bindungsmodells. Eine Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) konnte demnach nicht bestimmt werden.



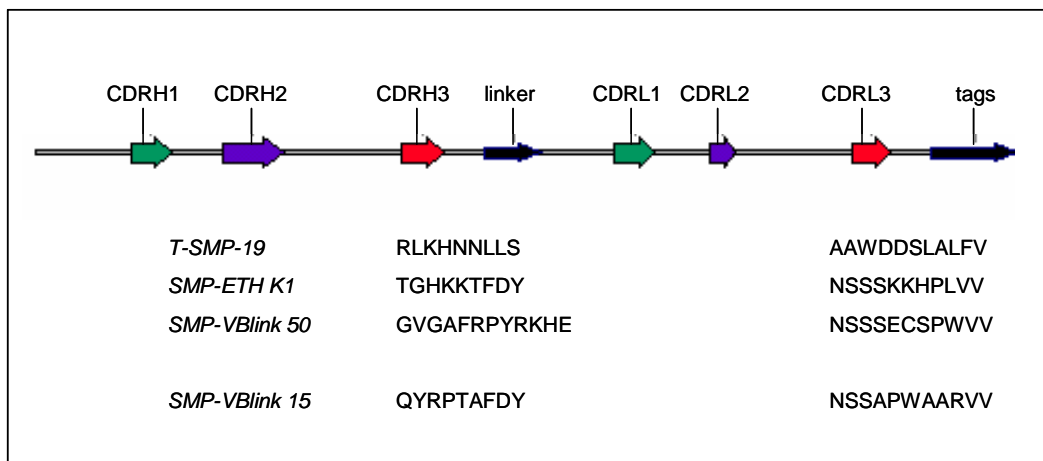
**Abb. 3.22 Bestimmung der Affinität des T-SMP-19 scFv für das SMP-Thiol Konjugat.** Es wurde eine kinetische Messung des Bindungsverhaltens verschiedener Konzentrationen des T-SMP-19 scFvs isoliert aus *N. tabacum* gegenüber dem an ein CM5 Chip immobilisierten SMP-Thiol Liganden durchgeführt. Die erhaltenen Messdaten wurden mithilfe der BIA Evaluation Software Version 4.1 unter Verwendung des „Heterogenous ligand (parallel reactions)“ Bindungsmodells analysiert (A). Des Weiteren ist der zugehörige „residual plot“ für die Assoziations- und Dissoziationsphase dargestellt (B)



### 3.8 Molekularbiologische Analyse der isolierten Klone

#### 3.8.1 CDR3-Sequenzanalyse

Klone, die durch Oberflächenplasmonresonanzanalyse als SMP-Binder identifiziert wurden (T-SMP-19, SMP-ETH K1 und SMP-VBlink 50) wurden auf Aminosäuresequenzebene miteinander verglichen. Zusätzlich wurde ein nicht-bindender scFv-Klon (SMP-VBlink 15) zum Vergleich hinzugezogen. Klone, welche aus der ETH-2 Bank isoliert wurden (SMP-ETH K1 und SMP-VBlink 50), können sich prinzipiell in den CDR3 Regionen der schweren und leichten Kette sowie durch den Typ der leichten Kette (*kappa* oder *lambda*) unterscheiden. Alle übrigen Regionen sind sequenzidentisch. Der scFv-Klon T-SMP-19 unterscheidet sich aufgrund seiner Herkunft (Griffin.1 Bank) zusätzlich in den anderen Komplementaritäts-determinierenden Regionen (CDRH1 und 2, CDRL1 und 2), sowie in begrenztem Ausmaß in den konstanten Bereichen. Die Klone aus der ETH-2 Bank wiesen alle leichte Ketten des Typs *lambda* auf. Ebenso der Klon T-SMP-19. In Abb. 3.23 ist die Organisation der scFvs schematisch abgebildet. Da sich zumindest die scFv-Fragmente aus der ETH-2 Bank nur in ihren CDR3 Regionen unterscheiden, sind diese zusätzlich in ihrer Aminosäuresequenz dargestellt.

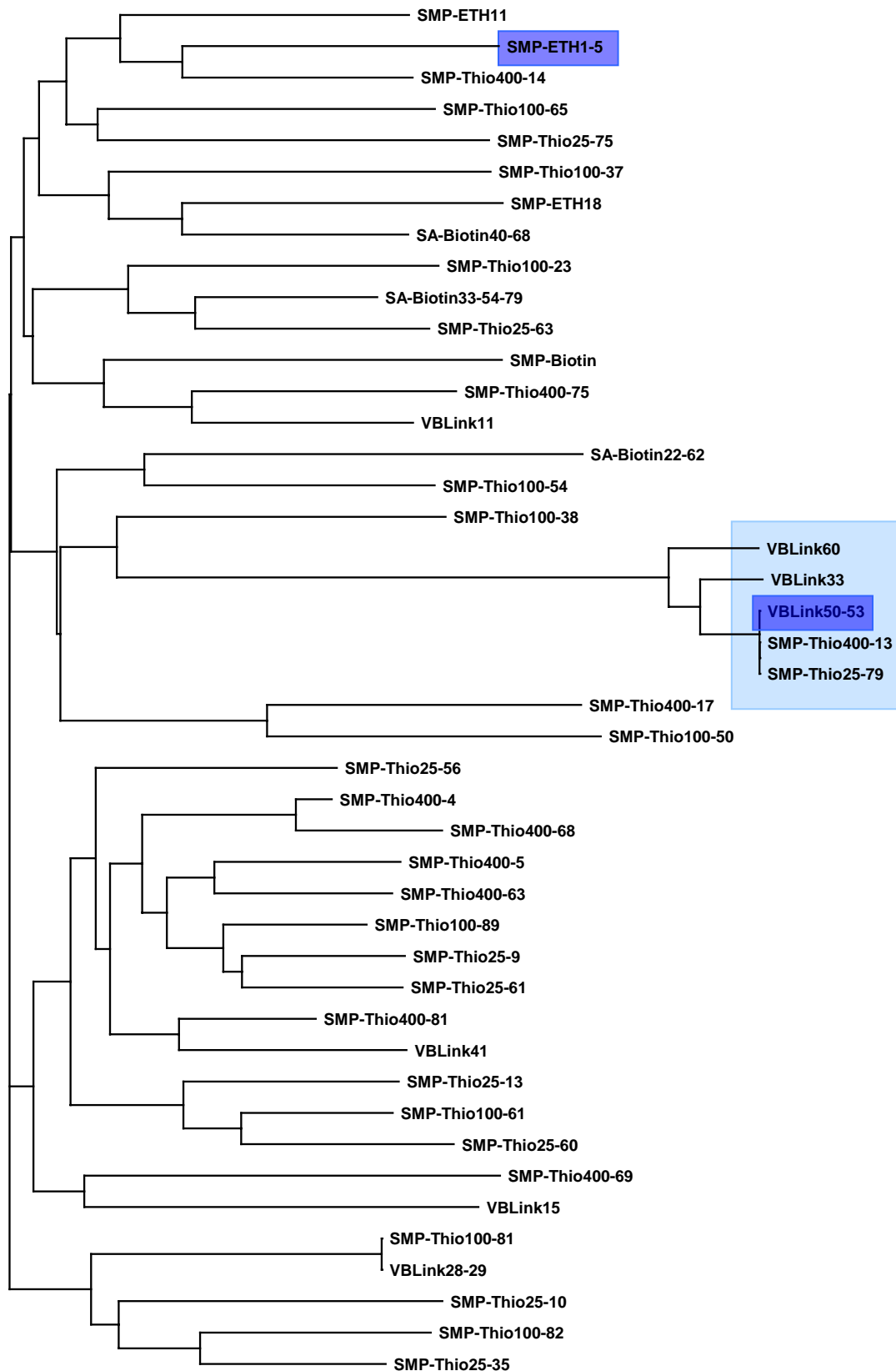


**Abb. 3.23 Schematische Darstellung der scFvs.** Die drei scFv-Klone T-SMP-19, SMP-ETH K1 und SMP-VBlink 50 sowie ein nicht-bindender scFv-Klon (SMP-VBlink 15) wurden hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz miteinander verglichen. Schematisch dargestellt sind die Komplementaritäts-determinierenden Regionen der schweren (CDRH) und leichten Kette (CDRL), sowie der linker und die Markierungen (tags). Da sich die scFv-Klone im Wesentlichen in den Aminosäuresequenzen der CDR3 Regionen unterscheiden, sind diese gesondert dargestellt.

Die CDRH3 Region des Klons SMP-VBlink 50 unterschied sich sowohl in der Aminosäuresequenz als auch in der Länge von den beiden anderen CDRH3 Regionen. Sie setzte sich aus zwölf Aminosäuren zusammen, verglichen mit neun Aminosäuren bei den beiden anderen Klonen. Die CDRL3 Regionen unterschieden sich in ihrer Aminosäuresequenz, wiesen jedoch eine einheitliche Länge von elf Aminosäuren auf. Das Verhältnis von polaren zu unpolaren Aminosäuren lag für die CDRH3 Regionen bei 2:1 (T-SMP-19; SMP-VBlink 15), 3,5:1 (SMP-ETH K1) und 1:1 (SMP-VBlink 50). Bei der CDRH3 Region des SMP-VBlink 50 scFv fiel außerdem eine nahezu symmetrische Aufteilung der Sequenz in einen polaren und einen unpolaren Teil auf. Für die CDRL3 Regionen lag das Verhältnis von polaren zu unpolaren Aminosäuren bei 1:2,7 (T-SMP-19), 1,75:1 (SMP-ETH K1 und SMP-VBlink 50) bzw. 1:1,75 (SMP-VBlink 15). Hier fiel für die beiden Klone SMP-ETH K1 und SMP-VBlink 50 wiederum eine klare Trennung der Sequenz in einen polaren und einen unpolaren Teil auf, wobei jeweils die letzten vier Aminosäuren unpolarer Natur waren.

### 3.8.2 Alignment von CDRH3 Sequenzen

Die Aminosäuresequenzen der CDRH3 Regionen aller aus der ETH-2 Bank isolierten Klone wurden mithilfe des Programms ClustalX (Thompson *et al.* 1997) miteinander verglichen. Dieses sollte Aufschluss darüber geben, ob im Verlauf aller Selektionen Klone ähnlicher CDRH3-Sequenz angereichert wurden und ob Ähnlichkeit zu den Sequenzen der SMP-Binder besteht. Unter Zuhilfenahme des Programms treeviewer32 wurde ein Stammbaum berechnet (Abb. 3.24). Es fällt eine Gruppe von fünf CDRH3 Sequenzen auf, von denen drei sequenzidentisch (SMP-VBlink 50, SMP-Thio 400-13, SMP-Thio 25-79) und zwei weitere hochgradig ähnlich sind (SMP-VBlink 33 und VBlink 60). Diese Gruppe beinhaltet den scFv-Klon mit den besten SMP-bindenden Eigenschaften (SMP-VBlink 50, 3.7.3).



**Abb 3.24 Alignment der CDRH3 Proteinsequenzen aller aus der ETH-2 Bank selektierten Klone.** Das Alignment wurde mithilfe des Programms ClustalX durchgeführt und die Grafik nach den allgemeinen Standards des Programms treeviewer32 erstellt. Blau hervorgehoben sind Klone, die eine Bindung an SMP zeigten (dunkelblau) bzw. deren CDRH3 Regionen identisch oder hochgradig ähnlich sind (hellblau). In dieser Gruppe befindet sich der scFv-Klon mit den besten SMP-bindenden Eigenschaften (SMP-VBlink 50).

### 3.9 Molekulare Analyse der Sulfonamid-Konjugate

Die für die Selektion Sulfonamid-spezifischer scFv-Phagen verwendeten Linker-Moleküle wurden hinsichtlich ihrer physiko-chemischen Eigenschaften miteinander verglichen. Zunächst wurden die Linker mithilfe des Programms Hyperchem 7 Molecular Modelling Systems (Hypercube, Inc) hinsichtlich verschiedener Parameter genauer charakterisiert (Tab. 3.11).

**Tab. 3.11 Eigenschaften der Linker-Moleküle**

	SMP	SMP-SiMAGCI	SMP-SiMAGTCI	SMP-Biotin	SMP-Thiol	SMP-VBlink
Länge (Å)	12,50	20,94	20,10	29,14	36,16	26,01
Breite (Å)	2,49	2,50	7,05	5,11	8,54	10,11
Volumen (Å <sup>3</sup> )	773,07	1153,71	1250,73	1699,82	2070,11	1365,10
Oberfläche (Å <sup>2</sup> )	485,02	703,27	756,65	998,81	1233,19	828,89
Hydrat. Energie (kcal/mol)	nb	-11,96	-10,14	-25,83	-27,10	-17,67
<b>Log P</b>	<b>nb</b>	<b>4,78</b>	<b>6,48</b>	<b>3,13</b>	<b>-0,93</b>	<b>3,73</b>
Polarisierbarkeit (Å <sup>3</sup> )	nb	37,92	41,50	59,85	67,96	45,94

Der Log P Wert bezeichnet den Hydrophobizitätskoeffizienten und ist von herausragender Bedeutung. Bei einem Wert > 0 liegt Hydrophobizität vor, ein Wert < 0 steht hingegen für Hydrophilizität.

Des Weiteren wurde mit dem Programm Hyperchem 7 die Verteilung der Oberflächenpotentiale über die Moleküle NHS-LC-Biotin, Thiol-Linker I (Graffinity) und Thiol-Linker II (VBlink, KDMCC) berechnet. Eine Optimierung der Berechnung erfolgte in MOPAC 6 mithilfe der AM1-Methode. Das Ergebnis ist in Abb. 3.25 dargestellt.

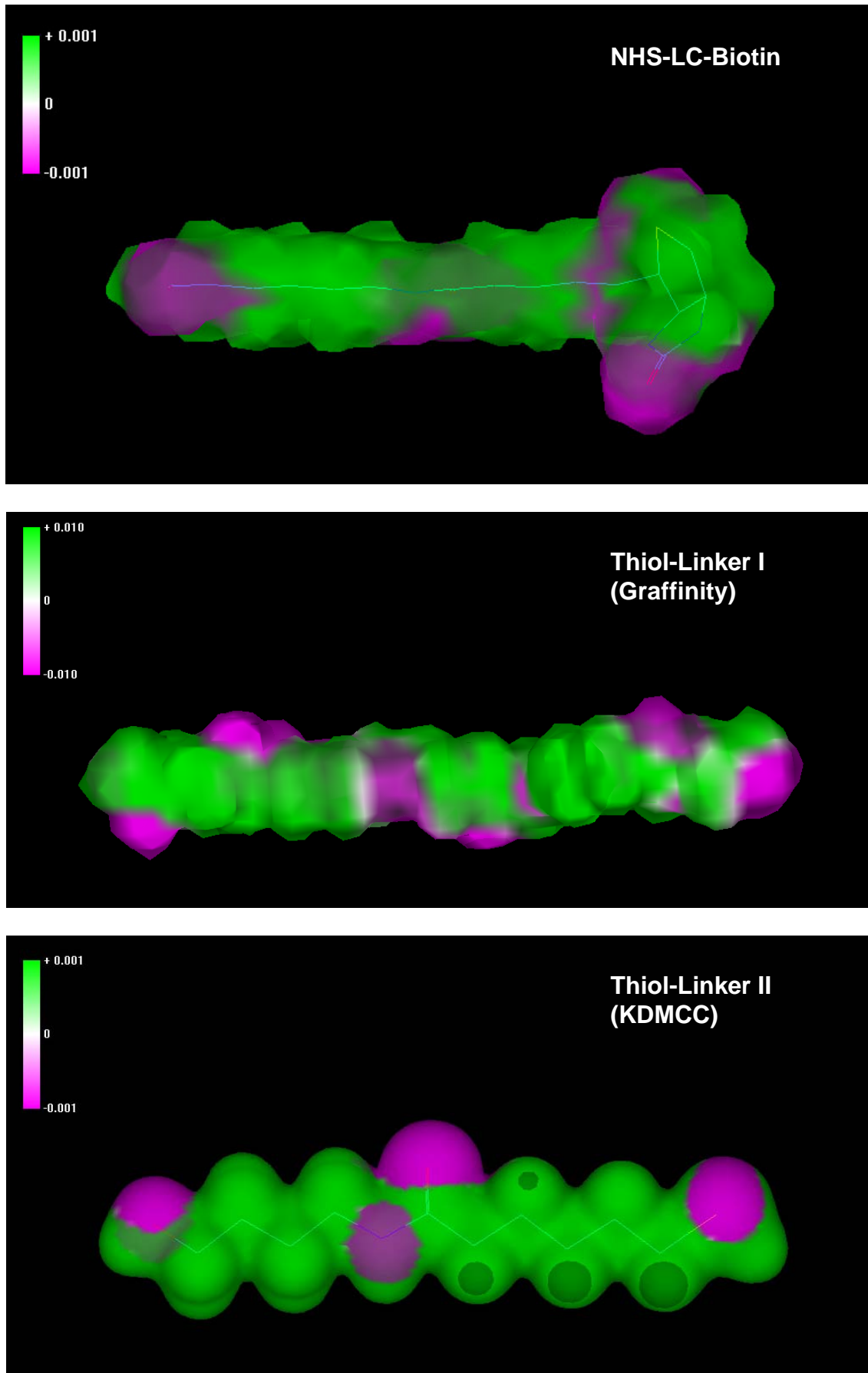
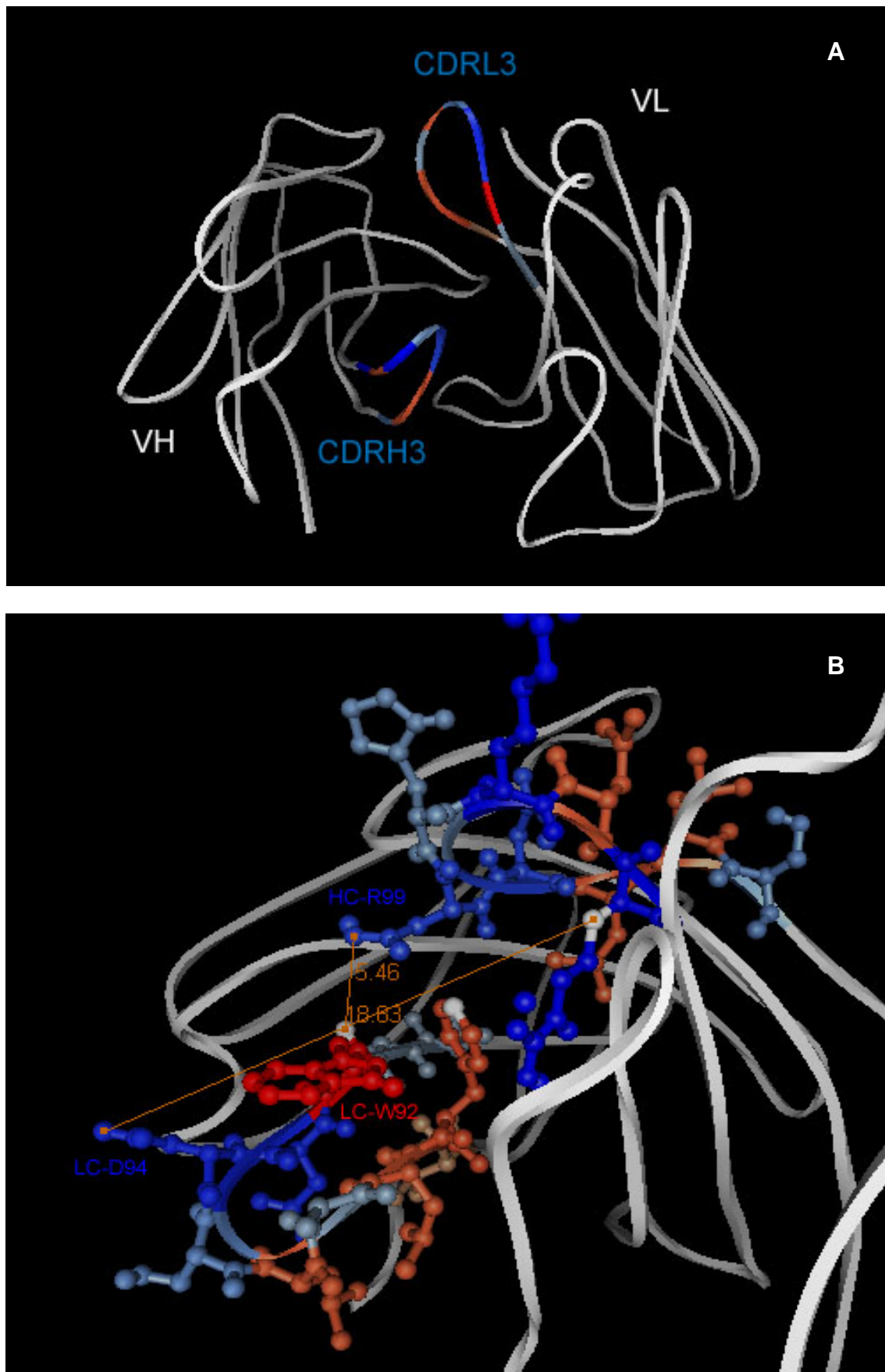


Abb. 3.25 Verlauf der Oberflächenpotentiale über die Linker-Moleküle (ohne SMP)

Hier fällt vor allem die deutlich inhomogenere Verteilung des Oberflächenpotentials im Thiol-Linker I (Graffinity) auf, die zu einer negativen Polarität tendiert.

### 3.10 Modellierung der 3D-Struktur von Antikörperfragmenten

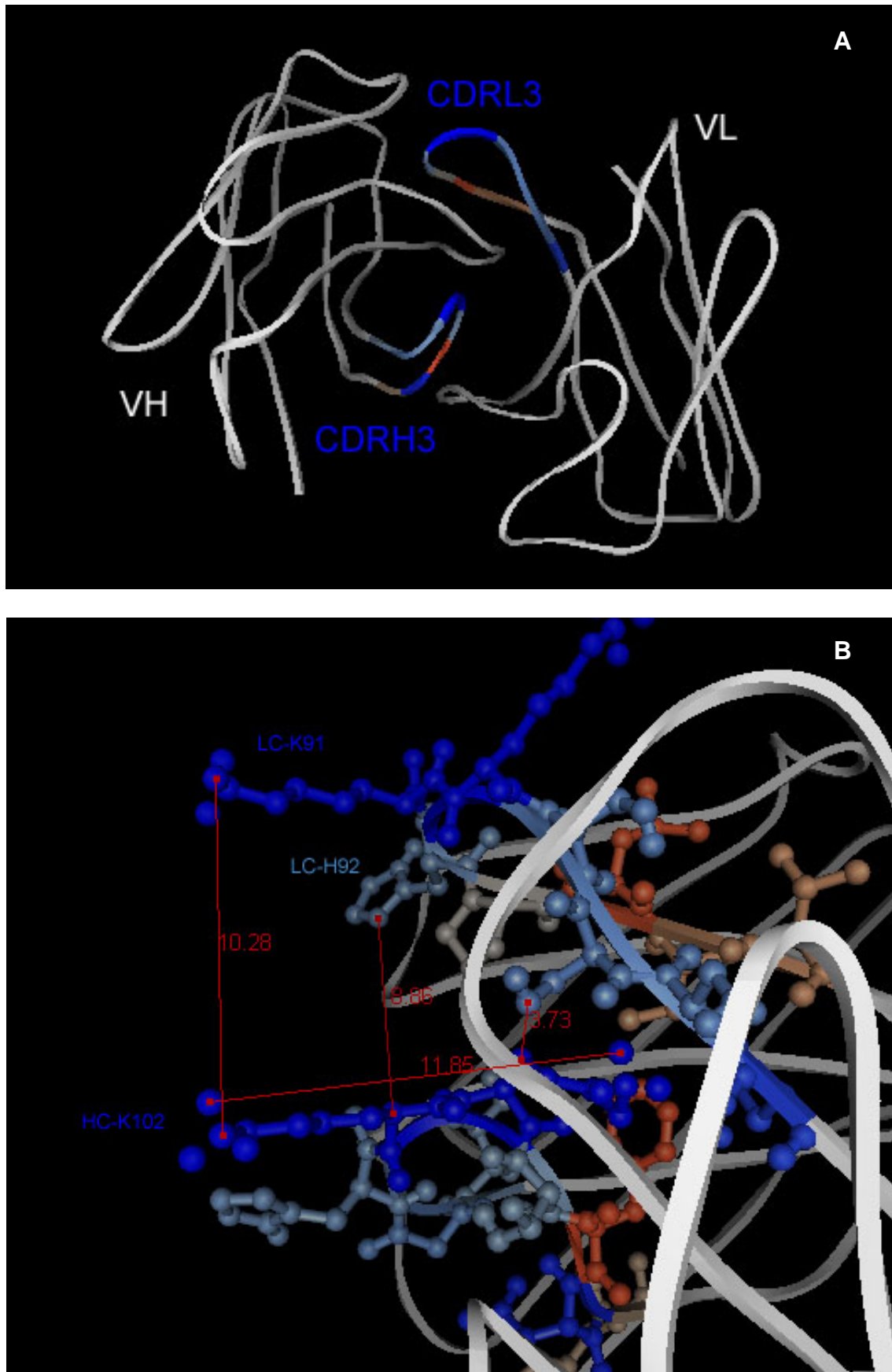
Für die drei Antikörperfragmente, die als SMP-Binder identifiziert werden konnten (T-SMP-19, SMP-ETH K1 und SMP-VBlink 50), wurde zur Berechnung der 3D-Struktur ein „Threading“ basierend auf dem WAM-Algorithmus (2.8) durchgeführt. Die Erstellung der Abbildungen erfolgte mithilfe des 3D Molecule Viewer (Vector NTI Advance 10, Invitrogen). Abb. 3.26 zeigt das Modell des T-SMP-19 scFvs. In den CDR3 Regionen sind die Aminosäuren entsprechend ihrer Hydrophobizität farblich gekennzeichnet. Die CDR3 Regionen der leichten und schweren Kette bilden zusammen eine unregelmäßige, schmale Kavität aus, die an der längsten Seite 18,83 Å misst und eine Breite von etwa 5,46 Å aufweist. Bei der Selektion, aus der der genannte Klon hervorging, wurde SMP gekoppelt an SiMAG Cl beads eingesetzt. Das SMP Molekül allein weist eine Länge von 12,50 Å und eine Breite von 2,49 Å auf. Zusammen mit dem Linker der SiMAG Cl beads misst das Molekül 20,94 Å in der Länge und 2,50 Å in der Breite (Tab. 3.11). In der putativen Bindungstasche selbst fällt eine leichte Dominanz polarer Aminosäuren gegenüber unpolarer Aminosäuren auf. Bei den Aminosäuren, die möglicherweise an einer Bindung beteiligt sein könnten, handelt es sich um LC-D<sub>94</sub>, LC-W<sub>92</sub>, LC-A<sub>91</sub> und LC-F<sub>99</sub> in der leichten und HC-R<sub>99</sub>, HC-N<sub>103</sub>, HC-N<sub>104</sub> und HC-L<sub>105</sub> in der schweren Kette.



**Abb. 3.26 Modellierung der 3D-Struktur für T-SMP-19 scFv.** Dargestellt sind der vollständige scFv (A) sowie eine Detailansicht der putativen Bindungstasche (B) mit farblicher Kennzeichnung der Hydrophobizität der Aminosäuren in den CDR3 Regionen.

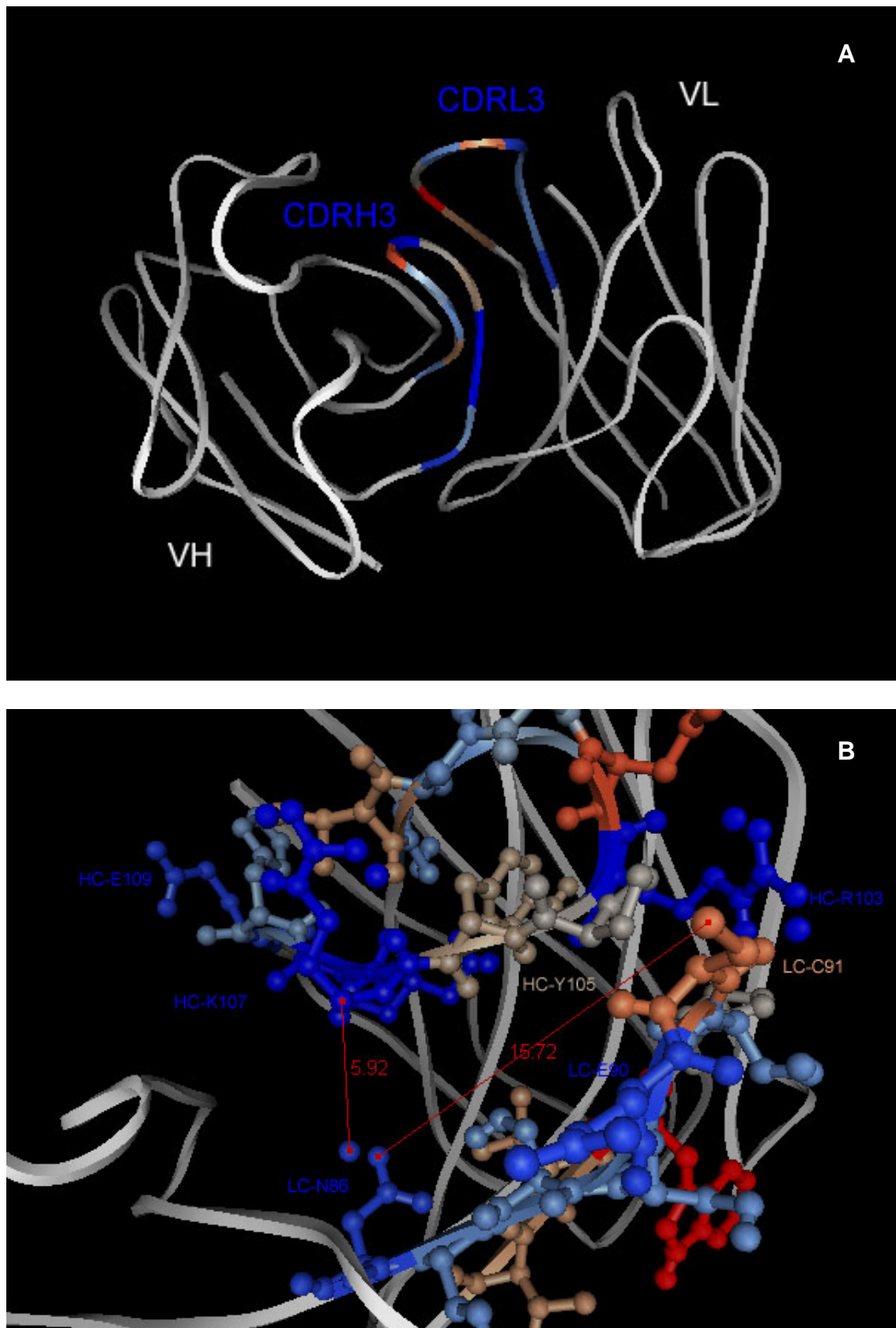
Abb. 3.27 wurde in der beschriebenen Weise erstellt und zeigt das Ergebnis des „Threadings“ für das Antikörperfragment SMP-ETH K1. Die putative Bindungstasche weist eine Tiefe von etwa 11,85 Å auf. Sie ist im vorderen Bereich relativ breit (etwa 10,28 Å) verjüngt sich aber zunehmend. Im mittleren Bereich weist sie eine Breite von etwa 8,86 Å auf, im hinteren Bereich nur noch eine Breite von etwa 3,73 Å. Im Rahmen des Selektionsverfahrens wurden SMP-gekoppelte SiMAG-TCI beads verwendet. SMP weist zusammen mit dem Linker der beads eine Länge von 20,10 Å und eine Breite von 7,05 Å auf. Bei den Aminosäuren, die möglicherweise in direktem Kontakt mit dem Bindungspartner stehen, liegt ein Verhältnis polarer und unpolarer Aminosäuren von 3:1 vor. Dabei handelt es sich um die Aminosäuren HC-K<sub>102</sub>, HC-H<sub>101</sub>, HC-T<sub>99</sub>, HC-K<sub>103</sub> und HC-F<sub>105</sub> der schweren sowie LC-K<sub>91</sub>, LC-H<sub>92</sub>, LC-P<sub>93</sub>, LC-S<sub>88</sub>, LC-V<sub>95</sub>, LC-S<sub>87</sub> und LC-N<sub>86</sub> der leichten Kette.





**Abb. 3.27 Modellierung der 3D-Struktur für SMP-ETH K1 scFv.** Dargestellt sind der vollständige scFv (A) sowie eine Detailansicht der putativen Bindungstasche (B) mit farblicher Kennzeichnung der Hydrophobizität der Aminosäuren in den CDR3 Regionen.

Die 3D-Struktur des SMP-VBlink 50 scFvs ist in Abb. 3.28 dargestellt. Die sehr kompakt strukturierte putative Bindungstasche bildet eine schmale Kavität mit einer Tiefe von etwa 15,72 Å und einer Breite von etwa 5,92 Å aus. Im Rahmen des Selektionsverfahrens wurde das Thiol-Linker Molekül SMP-VBlink der Firma KDMCC verwendet. Dieses weist eine Länge von 26,01 Å und eine Breite von etwa 7,05 Å auf. Die Aminosäuren, welche in direktem Kontakt mit dem Bindungspartner stehen könnten, wiesen ein Verhältnis von polaren zu unpolaren Aminosäuren von 2,75:1 auf. Dabei handelt es sich um die Aminosäuren LC-N<sub>86</sub>, LC-S<sub>88</sub>, LC-V<sub>95</sub>, LC-E<sub>90</sub>, LC-W<sub>94</sub>, LC-C<sub>91</sub>, LC-S<sub>92</sub> und LC-P<sub>93</sub> in der leichten sowie HC-E<sub>109</sub>, HC-H<sub>108</sub>, HC-R<sub>106</sub>, HC-K<sub>107</sub>, HC-Y<sub>105</sub>, HC-P<sub>104</sub> und HC-R<sub>103</sub> in der schweren Kette.



**Abb. 3.28 Modellierung der 3D-Struktur für SMP-VBlink 50 scFv.** Dargestellt sind der vollständige scFv (A) sowie eine Detailansicht der putativen Bindungstasche (B) mit farblicher Kennzeichnung der Hydrophobizität der Aminosäuren in den CDR3 Regionen.

#### 4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Sulfonamid-spezifischen „single chain“ Antikörpers, der über die Methode des „Phage Displays“ aus einem humanen synthetischen Antikörpergenrepertoire selektiert werden sollte. Für die dazu erforderliche Immobilisierung der Sulfonamide sollten verschiedene Immobilisierungsverfahren zur Kopplung niedermolekularer Liganden an feste Oberflächen erprobt und entwickelt werden. Die resultierenden Strategien zur Selektion Hapten-spezifischer scFv-Phagen über die Methode des sog. „Phage Displays“ (1.5) sollten optimiert und miteinander verglichen werden. Die beiden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Liganden Sulfanilamid (SA; 172,2 Da) und Sulfamethoxypyridazin (SMP; 280,3 Da) zählen zu den Sulfonamiden (1.1), einer Gruppe antibiotisch wirksamer Substanzen, welche sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin Verwendung finden. Alle Sulfonamide sind N<sup>1</sup>-substituierte Derivate des p-Aminobenzensulfonamids (Sulfanilamid) und somit strukturell verwandt. Aus immunologischer Sicht stellen sie aufgrund ihrer strukturellen Einfachheit und geringen Größe Haptene (1.1) dar.

Ein Ansatz zur Erzeugung Hapten-spezifischer Antikörper nutzte zunächst die klassischen Methoden zur Herstellung poly- bzw. monoklonaler Antikörper. Während polyklonale Antiseren nur eingeschränkt nutzbar waren (1.3), sind eine Reihe monoklonaler Hapten-spezifischer Volllängen-Antikörper in der Literatur beschrieben, so auch solche, die eine Spezifität für Sulfonamide aufweisen (Cliquet *et al.* 2003, Haasnoot *et al.* 2000, Muldoon *et al.* 1999, Sheth and Sporns 1991). Ein wesentliches Problem der Erzeugung Hapten-spezifischer monoklonaler Antikörper über die traditionelle Hybridomatechnik besteht jedoch in der bevorzugten Selektion sog. „interface binders“ (Charlton *et al.* 2001, Tuomola *et al.* 2000). Darunter versteht man Antikörper, die bevorzugt die konjugierte Form des Haptens und nicht die freie unkonjugierte Form erkennen (Charlton *et al.* 2001). Solche Antikörper sind für eine sensitive Detektion kleiner Moleküle ungeeignet. Sie werden angereichert, da die Haptene, um eine Immunantwort im Zuge der Immunisierung von Tieren zu ermöglichen, an Trägersubstanzen wie BSA oder Biotin gekoppelt werden. Die *in vitro* Isolation von rekombinanten Antikörpern aus Antikörpergenbibliotheken

über die Methode des „Phage Displays“ stellt eine geeignete Alternative dar (1.5). Grundsätzlich lassen sich post-Immunisierungs-Bibliotheken von sog. universellen oder „single pot“ Bibliotheken unterscheiden (Hust und Dübel 2004). Letztere werden je nach Herkunft der Antikörpergene als naive, semi-synthetische und synthetische Banken (Hust und Dübel 2004) bezeichnet (1.4). Die Isolation Hapten-spezifischer Antikörperfragmente über die Konjugation der Liganden an Trägerproteine ist für jede dieser Banken bekannt (Barbas III *et al.* 1993, Clackson *et al.* 1991, Jorgensen *et al.* 2002, Marks *et al.* 1991). ScFv-Fragmente gegen Sulfonamide, die auf direktem Weg aus einer universellen Bank selektiert wurden, sind jedoch bislang nicht beschrieben.

Bei der Selektion Hapten-spezifischer Antikörperfragmente sowohl aus post-Immunisierungs-Bibliotheken, als auch aus universellen Bibliotheken stellt sich wiederum das Problem der möglichen Selektion von „interface binders“. Antikörperfragmente die gegen eine konjugierte Form des Haptens generiert wurden, erkennen häufig nur das Konjugat aus Trägermolekül und Hapten, während das unkonjugierte Hapten nicht oder mit geringerer Affinität detektiert wird (Charlton *et al.* 2001, Moghaddam *et al.* 2001). Durch kompetitive Elutionsmethoden kann bevorzugt auf Antikörper selektiert werden, welche die freie Form des Haptens erkennen (Burmester *et al.* 2001, Moghaddam *et al.* 2001, Moghaddam *et al.* 2003). Bei der Suche nach Antikörperfragmenten gegen antibiotisch wirksame Moleküle ist dieser Ansatz nicht möglich, da diese Verbindungen das Wachstum der im Rahmen des „Phage Displays“ benötigten Wirtsbakterien hemmen. Um für antimikrobielle Substanzen ein Verfahren zu entwickeln, das dennoch die spezifische Selektion auf antigenbindende scFv-Phagen zulässt, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Selektionsverfahren optimiert und verglichen, die sich vor allem in der Art der Immobilisierung und Präsentation des Haptens sowie in der Struktur und den physiko-chemischen Eigenschaften der zur Immobilisierung verwendeten Linker-Moleküle voneinander unterscheiden. Zur Selektion Sulfonamid-spezifischer Antikörperfragmente mittels „Phage Display“ wurden zwei verschiedene humane synthetische Antikörpergenbibliotheken im scFv-Format eingesetzt (2.1.6).

#### 4.1 Immobilisierung der Sulfonamide

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Immobilisierung der Sulfonamide verwendeten Linker-Moleküle (Tab. 3.1) unterschieden sich zum einen in ihren Dimensionen zum anderen in ihren physiko-chemischen Eigenschaften, insbesondere in der Hydrophobizität (Tab. 3.11), der Polarität und der Verteilung des Oberflächenpotentials über das Molekül voneinander (Abb. 3.25). Dadurch bedingt muss von einer Linker-spezifischen Präsentation des Sulfonamids während des Selektionsverfahrens ausgegangen werden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Sulfonamide Sulfamethoxypyridazin (SMP) und Sulfanilamid (SA) waren für Kopplungs-Chemien zugänglich und sind im Rahmen der Lebensmittelanalyse von Bedeutung.

##### Direkte Kopplung an „magnetic beads“

Eine erste Methode zur Selektion Sulfonamid-spezifischer Antikörperfragmente sah die direkte Kopplung von Sulfamethoxypyridazin an Linker-Moleküle auf der Oberfläche magnetischer „beads“ vor. Zwei verschiedene „beads“ (SiMAG CI und SiMAG TCI) wurden verwendet, die sich in der Länge der Linker-Moleküle sowie der Art der endständigen reaktiven Gruppe unterschieden. Die Kopplung erfolgte über die benzenringständige Aminogruppe des Sulfamethoxypyridazin-Moleküls und basierte auf der Carbodiimidmethode. Diese wird in der Literatur häufig für die Kopplung von Haptenen an Trägermoleküle beschrieben (Albers *et al.* 2002, Chan *et al.* 2002). „Magnetic beads“ haben wesentliche Vorteile hinsichtlich der Effizienz eines Pannings (McConnell *et al.* 1999) (1.5). Das Molekül liegt trotz Immobilisierung in Lösung vor („batch“-Verfahren), was insbesondere für die Präsentation kleiner Moleküle entscheidend ist. Unter Verwendung von „magnetic beads“ konnten bereits wenige Hapten-spezifische Antikörper isoliert werden. In den meisten Fällen erfolgte die Kopplung der Liganden soweit beschrieben (Jørgensen *et al.* 2002) über Biotin an Streptavidin-gekoppelte „magnetic beads“ (Moghaddam *et al.* 2003). Dies hat den Nachteil der erhöhten unspezifischen Bindung. In einem weiteren Fall ist eine direkte Immobilisierung des Liganden über die aufwändige Synthese eines flexiblen Linkers beschrieben worden (Mercader und Skerra 2002). Allerdings

ist eine zu komplexe Synthese von Linker-Molekülen für die breite Anwendung unpraktikabel.

Das Problem der bevorzugten Selektion von „interface binders“ (Charlton *et al.* 2001, Tuomola *et al.* 2000) sollte durch die direkte Kopplung der Haptene über lange flexible Linker ausgeschlossen sein. Die auf den hier verwendeten „beads“ präimmobilisierten C6- bzw C8-Linker Moleküle ermöglichten eine geeignete Präsentation des SMP-Moleküls (2.1.13). Beide Linker waren ausgesprochen hydrophob mit Log P Werten von 4,78 (SiMAG Cl) bzw. 6,48 (SiMAG TCI) (Tab. 3.11). Daher sind hydrophobe Interaktionen von scFv-Phagen mit den Linkern während der Selektionen nicht auszuschließen. Hydrophobe Interaktionen mit Linkern und Oberflächen finden häufig über hydrophobe „patches“ statt und können zu unspezifischen Bindungen und partieller Denaturierung des Proteins führen (Engel 2004, Mrksich and Whitesides 1996).

Kopplungserfolge werden vom Hersteller (Chemicell, Berlin) mithilfe von Fluoreszenz-markierten Molekülen überprüft, was für das hier verwendete Molekül aus technischen Gründen nicht möglich war. Um ein ausreichendes Maß an immobilisiertem SMP zu gewährleisten, wurde das Molekül zur Kopplung im 10 fachen molaren Überschuss eingesetzt (2.4.3). Indirekt wurde der Erfolg der Immobilisierung durch die spätere Selektion antigenspezifischer scFv-Fragmente nachgewiesen.

### **Indirekte Kopplung über Sulfonamid-Biotin-Derivate**

Eine Alternative zur meist durchgeführten Derivatisierung kleiner Moleküle („small molecules“) mit Trägerproteinen wie BSA (Barbas III *et al.* 1993, Griffith *et al.* 1994, Marks *et al.* 1991) oder Ovalbumin (Yuan *et al.* 1997) ist die Kopplung an Biotin-Linker Moleküle. Diese haben den Vorteil, dass Biotin als kleines (244 Da) natürlich vorkommendes Vitamin deutlich weniger immunogen ist, als große Trägerproteine und dass es mit sehr hoher Affinität an Avidin bzw. Streptavidin bindet. Letzteres kann für die Immobilisierung Biotin-konjugierter Moleküle ausgenutzt werden. Dieses Verfahren ist in der Literatur mehrfach für die Kopplung kleiner Liganden beschrieben (Korpimäki *et al.* 2002, Rodi *et al.* 2001, Sche *et al.* 1999, Vaughan *et al.* 1996). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde sowohl Sulfamethoxypyridazin (SMP) als auch Sulfanilamid (SA)

mithilfe von EZ-Link<sup>®</sup> NHS-LC-Biotin der Firma Pierce (Abb. 2.5) derivatisiert. Dabei handelt es sich um einen N-Hydroxysuccinimid Ester des Biotins, der in neutralem bis alkalischem pH Bereich sehr effizient mit primären Aminogruppen reagiert und stabile Amid-Bindungen ausbildet (2.1.14). Im SMP-Molekül existiert eine dieser Art von Reaktion zugängliche primäre Aminogruppe. Dabei handelt es sich um die Aminogruppe des p-Aminobenzol-Restes des „Sulfonamid-spezifischen“ Teils des Moleküls (Abb. 1.1 und 1.2). Das SA-Molekül hingegen trägt neben der eben genannten primären Aminogruppe eine zweite an der Sulfofunktion des Moleküls. Diese sollte zwar elektrochemisch für eine Reaktion mit dem NHS-Ester des Biotins begünstigt sein, allerdings kann man eine Reaktion mit der p-Aminogruppe des Benzolrings nicht ausschließen. Somit kann das Molekül über zwei verschiedene funktionelle Gruppen gekoppelt sein, von denen eine die Sulfonamid-spezifische Gruppe des Moleküls erhält. Die Selektion kreuzreaktiver Antikörper ist somit nicht ausgeschlossen. Des Weiteren wäre denkbar, dass das Molekül gleichzeitig über beide primäre Aminogruppen eine Derivatisierung erfährt. Durch Bestimmung der Masse mittels LC-MS (Abb. 3.2) konnte jedoch eine 1:1 Stöchiometrie der Kopplungsreaktion nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnte so der Nachweis für die erfolgreiche Derivatisierung erbracht werden. Das Linker-Molekül des EZ-Link<sup>®</sup> NHS-LC-Biotin hat eine Länge von 22,4 Å als SMP-Konjugat weist das Molekül insgesamt eine Länge von 29,14 Å auf. Es ist durch die Integration mehrerer polarer Gruppen mit einem Log P Wert von 3,13 (Tab. 3.11) deutlich weniger hydrophob als die beiden SiMAG Linker.

### **Indirekte Kopplung über Sulfonamid-Thiol-Linker-Derivate**

Eine weitere Immobilisierungsstrategie sah die Derivatisierung von Sulfamethoxypyridazin mit Linker-Molekülen vor, die terminale SH-Gruppen aufwiesen (Thiol-Linker, 2.1.15). Dieses Immobilisierungsprinzip findet unter anderem Verwendung bei der Kopplung SH-Gruppen tragender Moleküle an Carboxymethyldextran Matrices, die im Rahmen der Oberflächenplasmonresonanzanalyse verwendet werden (Johnsson *et al.* 1995). Im vorliegenden Fall erfolgte die Immobilisierung der Konjugate basierend auf der Maleimid-Chemie für Sulfhydryl-Gruppen an Maleimid-aktivierten Mikrotiterplatten (Abb. 2.6). Das Sulfamethoxypyridazin wurde über die benzenringständige primäre



Aminogruppe (SMP-Thiol-Linker, Graffinity, Dickopf *et al.* 2004) bzw. die pyridazinringständige Methoxygruppe (SMP-VBlink-Linker, KDMCC) konjugiert. In zuletzt genanntem Fall blieb die in allen Sulfonamiden übereinstimmende p-Aminobenzolgruppe erhalten (Abb. 1.1 und 1.2). Prinzipiell ist über diese Art der Kopplung die Selektion kreuzreaktiver Antikörperfragmente möglich. Der SMP-Thiol-Linker ist mit 36,16 Å deutlich länger als der SMP-VBlink-Linker mit 26,01 Å. Des Weiteren ist der SMP-Thiol-Linker aufgrund mehrerer integrierter Oligoethylenglycol-Gruppen deutlich hydrophiler als alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Linker (Log P -0.93, Tab. 3.11). Auch die Verteilung des Oberflächenpotentials dieses Linkers ist dadurch bedingt deutlich inhomogener und tendiert an mehreren Stellen zu einem eher negativen Potential (Abb. 3.25). Der SMP-VBlink-Linker liegt dagegen in der Hydrophobizität etwa im Bereich des SMP-Biotin Moleküls (Log P 3,73).

#### 4.2 Die Antikörpergenbibliotheken

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene humane synthetische Antikörpergenbibliotheken im scFv Format verwendet. Die Griffin.1 Bank (2.1.6) wurde zur Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an SMP-gekoppelten SiMAG Cl beads eingesetzt. Bei der anschließenden PCR-Analyse selektierter scFv-Klone (3.4.1) stellte sich heraus, dass nur ein relativ geringer Prozentsatz der Klone vollständige V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Ketten-Gene trugen (Tab. 3.8). Dabei handelte es sich um die Auswirkungen eines in der Literatur beschriebenen Phänomens, wonach durch unvollständigen Restriktionsverdau oder Selbstligation des Phagemids während der Herstellung der Bibliothek eine Verunreinigung der Bank mit unvollständigen oder „insert“-freien scFv-Klonen stattfindet (Courtney *et al.* 1995, Krebber *et al.* 1997, Seehaus *et al.* 1992, Tur *et al.* 2001). Aufgrund eines Wachstumsvorteils „insert“-freier Phagen kommt es mit jeder Amplifikation der Bank zu einer Anreicherung dieser Phagen, wodurch die Möglichkeit der Selektion spezifischer Phagen zunehmend eingeschränkt wird (Krebber *et al.* 1997). Die Griffin.1 Bank wurde bereits einer Vielzahl an Amplifikationen unterworfen und schien daher für die Selektion Antigen-spezifischer scFv-Phagen ungeeignet. Für alle weiteren Selektionen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, wurde die ETH-2 Bank

eingesetzt (Viti *et al.* 2000). Sie wurde als neue Charge vom Hersteller (ETH, Zürich) bezogen und eine PCR-Analyse der ersten Amplifikation zeigte, dass alle untersuchten Klone ein vollständiges scFv-„insert“ trugen (Abb. 3.1). Grundlage dieser „single framework“ Bibliothek bilden das Keimbahngen DP-47 (Tomlinson *et al.* 1992) für die schwere und die Segmente DPK-22 oder DPL-16 für die leichte Kette vom  $\lambda$ - bzw.  $\kappa$ -Typ (Marks *et al.* 1991, Cox *et al.* 1994). Durch Randomisierung der CDR3 Regionen erhielt die Bank eine Diversität von  $5 \times 10^8$  unabhängigen Klonen, was im Vergleich zu anderen Antikörpergenbibliotheken eine durchschnittliche Größe ist (Hust *et al.* 2004). Das DP-47 Segment gewährleistet eine gute Exprimierbarkeit der resultierenden scFvs und die korrekte Faltung des Proteins auf scFv-Phagen und in Lösung (Viti *et al.* 2000). Es gehört zur Gruppe der V<sub>H</sub>3-Domänen, die sich durch eine Reihe vorteilhafter biophysikalischer Eigenschaften auszeichnen. So lassen sie sich beispielsweise ohne das Entstehen von „inclusion bodies“ und Dimeren in *E. coli* exprimieren (Ewert *et al.* 2003). Die Diversität der Bindungsmöglichkeiten ist in „single framework“ Bibliotheken reduziert. Zwar hat die CDRH3 Region die größte Variabilität (Seal *et al.* 2000, Shirai *et al.* 1996, Shirai *et al.* 1999) und ist maßgeblich an der initialen Bindung an das Antigen beteiligt (Padlan *et al.* 1994). Bindungsinteraktionen sind im Allgemeinen jedoch nicht auf die CDR3 Regionen beschränkt, sondern auch für CDR1 und -2 sowie „framework“ Regionen ist eine entscheidende Beteiligung an Bindungsereignissen erwiesen (Ewert *et al.* 2004, Knappik *et al.* 2000). Dieses ist vor allem hinsichtlich der Selektion Hapten-spezifischer Antikörperfragmente zu berücksichtigen.

### 4.3 Selektion Sulfonamid-spezifischer „single chain“ Fragmente

Bei der *in vitro* Selektion Antigen-spezifischer scFv-Phagen über die Methode des „Phage Displays“ sollte nach Breitling und Dübel (1997) der Phagentiter eluierter scFv-Phagen im Verlauf von maximal 6 Selektionsrunden von  $\sim 10^4$  auf  $\sim 10^8$  cfu ansteigen. Bei der Durchführung weniger Selektionsrunden besteht insbesondere bezüglich „small-molecule“-spezifischer Antikörper die Gefahr, dass keine ausreichende Anreicherung spezifischer Phagen stattgefunden hat (Sche *et al.* 1999, 2001). Werden hingegen zu viele Selektionsrunden

durchgeführt, kann es zur Anreicherung unvollständiger oder mutierter scFv-Fragmente kommen (de Bruin *et al.* 1999, Cárcamo *et al.* 1998, Tur *et al.* 2001), da die entsprechenden Klone in *E. coli* einen Wachstumsvorteil aufweisen. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit 3 bis 4 Selektionsrunden pro Antigen durchgeführt, in deren Verlauf ein deutlicher Anstieg des Titors eluierter scFv-Phagen messbar war.

### **Selektion an SMP-gekoppelten SiMAG „beads“**

Zur Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen an SMP-gekoppelten SiMAG CI (3.3.1) und SiMAG TCI (3.3.2) „beads“ wurden jeweils drei Selektionsrunden durchgeführt. Sowohl für die SiMAG CI (Griffin.1 Bank) als auch für die SiMAG TCI „beads“ (ETH-2 Bank) konnte im Verlauf der drei Selektionsrunden ein deutlicher Anstieg des Phagentiters der eluierten scFv-Phagen beobachtet werden, obwohl aufgrund niedriger Amplifikationsraten aus den Selektionsrunden zum Teil weniger als  $10^{12}$  scFv-Phagen pro Runde eingesetzt wurden. Zwar nahmen auch die Phagentiter in den Fraktionen der letzten Waschschriffe über die drei Selektionsrunden zu, jedoch fiel der Anstieg in den Eluatn deutlich stärker aus. Die unterschiedlich gewählten Elutionsbedingungen (Glycin HCl pH 2,2 bei SiMAG CI und Glycin HCl pH 2,8 bei SiMAG TCI) hatten keinen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der Phagentiter (Abb. 3.4 und 3.5). Hingegen führte die erhöhte Stringenz des Waschens (40 Waschschriffe bei SiMAG TCI gegenüber 25 Waschschriffe bei SiMAG CI) zu einer Reduktion des Phagenhintergrundes, der nach dem letzten Waschschriff noch detektiert werden konnte, was bei etwa gleich bleibenden Elutionstitern auf eine Verringerung der unspezifischen Bindung hindeutet.

### **Selektion an SA- und SMP-Biotin**

Die Selektion SA- bzw. SMP-spezifischer scFv-Phagen wurde an Streptavidin gekoppelten Mikrotiterplatten durchgeführt, an denen SA-Biotin bzw. SMP-Biotin immobilisiert wurde. Vor jeder der vier Selektionsrunden wurde eine Präselektion am unkonjugierten Biotin-Linker durchgeführt, um unspezifisch an den Biotin-Linker oder die Streptavidin-Oberfläche der Mikrotiterplatte bindende Phagen zu entfernen. Über drei Selektionsrunden hinweg war ein Anstieg des Phagentiters in den Eluatn (Probe) zu beobachten (Abb. 3.6 und 3.7). In der

vierten Runde nahm der Wert hingegen um etwa 50 % ab. Da in der vierten Selektionsrunde dieselbe Anzahl scFv-Phagen eingesetzt wurde wie in der dritten (3.3.3 und 3.3.4), müssen systeminterne Gründe zu diesem Abfall des Phagentiters geführt haben. So wäre es beispielsweise möglich, dass die im Rahmen des „Pannings“ verwendeten *E. coli* XL1 Zellen durch eine Veränderung der Kulturbedingungen ihre Fähigkeit zur Ausbildung von F-Pili teilweise verloren haben. Sie wären somit nicht mehr effizient infizierbar. Sicherlich ist auch denkbar, dass die Anreicherung Antigen-spezifischer scFv-Phagen nicht ausreichend erfolgte. Die Tatsache, dass bei beiden Selektionsverfahren der Phagentiter, der aus den Präselektionen resultierte, zum Teil deutlich höher lag als der aus den eigentlichen Eluat, zeigt, dass ein hoher Prozentsatz der eingesetzten scFv-Phagen unspezifisch an das Biotin-Linker-Molekül, das Streptavidin bzw. die Oberfläche der Mikrotiterplatten bindet. Diese Beobachtung deckt sich mit der Literaturbekannten Tatsache der erhöhten unspezifischen Bindung an Trägerprotein- insbesondere Streptavidin-gekoppelte Mikrotiterplatten (Kodadek *et al.* 2004).

Für die Selektion an SA-Biotin war der Phagentiter aus den Präselektionen bis zur vierten Selektionsrunde (mit Ausnahme der 2.) höher als der Elutionstiter (Abb. 3.6). Bei Einsatz von SMP-Biotin hingegen näherte sich der Präselektionstiter bereits in der 3. Selektionsrunde dem Wert aus der eigentlichen Elution an. In der vierten Selektionsrunde sank dieser Phagentiter dann um eine Zehnerpotenz unterhalb des Titers aus der spezifischen Elution. Dieses Resultat deutet an, dass hier eine spezifische Selektion stattgefunden haben kann.

### **Selektion an SMP-Thiol-Linker-Molekülen**

Die Selektion SMP-spezifischer scFv-Phagen unter Verwendung von Thiol-Linker-Molekülen erfolgte an Maleimid-aktivierten Mikrotiterplatten (2.4.11). Die Platten wurden zum Absättigen nicht-abreagierter Maleimid-Gruppen zunächst mit  $\beta$ -Mercaptoethanol behandelt. Anschließend wurde zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen Roti<sup>®</sup> Block Blockierungslösung eingesetzt. Im Verlauf der vier durchgeführten Selektionsrunden wurde vor jeder Runde (SMP-Thiol) bzw. nur vor den ersten beiden (SMP-VBlink) eine Präselektion durchgeführt. Der Verlauf der Phagentiter über die vier Selektionsrunden ergab

für das SMP-Thiol Molekül in allen 3 Konzentrationsbereichen (400, 100 und 25 pM) einen Anstieg der Phagentiter für die eluierten Phagen, der in einem Phagentiter von  $1,4$  bis  $2,3 \times 10^8$  cfu resultierte (Abb. 3.8). Lediglich bei der SMP-Thiol Konzentration von 25 pM war ein leichter Abfall des Titors in der letzten Selektionsrunde zu beobachten, was am ehesten auf eine Messungenauigkeit zurückzuführen ist. Die Konzentration des eingesetzten SMP-Thiol Liganden war somit nicht entscheidend für den Verlauf der Phagentiter. Die Phagentiter aus den letzten Waschschritten blieben bei der Selektion an SMP-Thiol insgesamt deutlich hinter denen aus den Eluat zurück und tendierten zu einer Stagnation in den letzten beiden Selektionsrunden, was auf einen relativ geringen Hintergrund unspezifischer scFv-Phagen in der letzten Selektionsrunde schließen lässt. Beim Einsatz des SMP-VBlink Konjugates kam es in der zweiten Selektionsrunde zu einem deutlichen Abfall des Phagentiters sowohl im Eluat als auch im letzten Waschschrift (Abb. 3.9). Auch hier sind Messungenauigkeiten oder eine Reduktion der Infektionsfähigkeit der *E. coli* XL1 Zellen anzunehmende Gründe. Die geringere Anzahl für die zweite Selektionsrunde eingesetzter scFv-Phagen kann nicht ausschlaggebend sein, da dieses auch bei der Selektion mit SMP-Thiol der Fall war. Ab der zweiten Selektionsrunde war jedoch auch hier ein deutlicher Anstieg der Phagentiter in den Eluat zu verzeichnen, der in einem Wert von  $8,8 \times 10^7$  cfu in der vierten Selektionsrunde resultierte. Insgesamt scheinen in diesen Ansatz die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen an der Matrix sowie die gewählten Selektionsbedingungen einen positiven Effekt auf die Spezifität der Selektionen gehabt zu haben.

### **Vergleich der verschiedenen Selektionsansätze**

In Vorwegnahme der aus den Bindungsanalysen resultierenden Ergebnisse lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Verwendung von langen flexiblen Linker-Molekülen für eine Selektion Hapten-spezifischer scFv-Phagen geeignet zu sein scheint. Allgemein erlaubte die ETH-2 Bank, verglichen mit der Griffin.1 Bank, die Selektion eines deutlich höheren Anteils vollständiger sowie exprimierbarer Antikörperfragmente (Tab. 3.8 und 3.9).

Der Klon mit den besten SMP-bindenden Eigenschaften (SMP-VBlink50,  $K_D$   $7,74 \times 10^{-8}$  M) ging aus der Selektion an dem SMP-VBlink Thiol-Linker Konjugat

hervor (2.1.15, 2.4.11 und 3.3.6). Diese Selektion wurde an Maleimid-aktivierten Mikrotiterplatten ausgeführt. Die Handhabung dieser Selektion erforderte einen vergleichsweise geringen Zeitaufwand. Zudem zeichnete sich diese Matrix durch eine vergleichsweise (s.u.) geringe Tendenz zur unspezifischen Bindung aus. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit über die Durchführung einer Präselektion der eingesetzten scFv-Phagen sowie die zusätzliche Blockierung unspezifischer Bindestellen an der Bindungsmatrix durch ein synthetisches Polymergemisch (Roti Block) weiter minimiert.

Die Selektion an dem zweiten Thiol-Linker Konjugat (SMP-Thiol) erfolgte ebenfalls an Maleimid-aktivierten Mikrotiterplatten, weshalb die Handhabung vergleichbar war (2.1.15, 2.4.11 und 3.3.5). Klone, die aus diesem Selektionsverfahren hervorgingen, wiesen zum Teil ein identisches oder hochgradig ähnliches CDRH3-Motiv (4.7.2) wie der SMP-VBlink 50 Klon (s.o) auf, was auch hier antigen-bindende Eigenschaften dieser Klone sowie eine prinzipielle Eignung dieses Selektionsverfahrens nahe legt. Die Validierung dieses Systems durch eine Verifizierung der Affinitäten der betreffenden Klone konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Die beiden Selektionsverfahren, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an SMP-gekoppelten „magnetic beads“ durchgeführt wurden (2.1.13, 2.4.4, 2.4.6, 3.3.1 und 3.3.2) waren in ihrer Handhabung vergleichsweise schwieriger und erforderten daher einen höheren Zeitaufwand. Des Weiteren war ein vergleichsweise höherer Hintergrund unspezifischer scFv-Phagen vorhanden. Dies konnte aber durch die Erhöhung der Stringenz des Waschens (vgl. 3.3.1 und 3.3.2) reduziert werden. Eine prinzipielle Eignung dieser Verfahren für die Selektion Hapten-spezifischer scFv-Phagen wurde durch die Tatsache belegt, dass die anderen beiden im Rahmen dieser Arbeit isolierten aktiven scFv-Klone aus diesen beiden Selektionsverfahren hervorgingen.

Als ungeeignet erwies sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Verwendung Streptavidin-gekoppelter Mikrotiterplatten, an denen zur Selektion SA- bzw. SMP-Biotin immobilisiert wurde (2.1.14, 2.4.8, 3.3.3 und 3.3.4). Obwohl bei diesen Verfahren vor jeder Selektionsrunde eine Präselektion der scFv-Phagen durchgeführt wurde und nach den Selektionen auf CDRH3 Sequenzebene eine z.T. starke Anreicherung vorhanden war (Tab. 3.10), konnte in keinem einzigen Fall ein aktiver SA- bzw. SMP-Binder identifiziert werden. Dieses ist sicherlich

auf die literaturbekannte Tatsache zurückzuführen, dass Streptavidin in hohem Maße unspezifische Hintergrundbindung fördert (Kodadek *et al.* 2004). Dieses machte die spezifische Anreicherung von Antikörperfragmenten gegen sehr kleine Moleküle wie SA (172,2 Da) und SMP (280,3 Da) unmöglich.

#### 4.4 Expression und Aufreinigung der Antikörperfragmente

Die Isolation von scFv-Fragmenten erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus der periplasmatischen Proteinfraction von *E. coli* sowie in Form von nativen Proteinisolationen aus transgenen Tabakpflanzen (4.6). Für die Charakterisierung selektierter scFv-Klone mittels Oberflächenplasmonresonanzanalyse wurden diese in *E. coli* exprimiert und über die Isolation der periplasmatischen Proteinfraction bzw. direkt aus dem Kulturüberstand aufgereinigt.

Die Sekretion von Proteinen in das Periplasma ist in *E. coli* ein natürlicher Prozess (Pugsley *et al.* 1993), dessen Abhängigkeit von einer Signalsequenz wie beispielsweise *pelB* oder *ompA* (Plückthun *et al.* 1996) bekannt ist. Im vorliegenden Fall liegt N-terminal vom scFv-Gen die *pelB* leader Sequenz aus *Erwinia cavotovora* Pectatlyase. Für die vorliegende Arbeit ergab sich daher die Möglichkeit der scFv-Isolation über die Präparation der periplasmatischen Proteinfraction (3.5.1) bzw. aufgrund der partiellen Durchlässigkeit der äußeren Membran (Plückthun und Skerra 1989) direkt aus dem Kulturüberstand von *E. coli* Expressionskulturen (3.5.2). Beides wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich durchgeführt (Abb. 3.12 und 3.13) und es wurden mit beiden Methoden etwa gleiche Ausbeuten an rekombinantem Protein erreicht. Da das DP-47 Segment der schweren Ketten der ETH-2 Bank zur Gruppe der V<sub>H</sub>3-Domänen gehört, konnten alle scFvs, die aus dieser Bank hervorgingen über Protein A-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden (Hoogenboom *et al.* 1992).

#### 4.5 Molekularbiologische Analyse selektierter „single chain“ Fragmente

Eluierte scFv-Klone, die aus der jeweils letzten Runde der Selektionen hervorgingen, wurden anschließend molekularbiologisch analysiert. Aufgrund

der bereits erwähnten Wachstumskonkurrenz kann es im Verlauf mehrerer Selektionsrunden zur Anreicherung unvollständiger scFv-Klone kommen (1.5). Der Prozentsatz vollständiger scFv-Phagen sollte mittels PCR-Analyse ermittelt werden. Darüber hinaus kann es im Verlauf der Selektionen zur Anreicherung solcher Phagen kommen, deren scFv-Gen durch interne Stopcodons, Deletionen oder Leserasterverschiebungen keinen ORF aufweisen (Cárcamo *et al.* 1998, Goldman *et al.* 2000, Jacobsson und Frykberg, 1996). Die Anreicherung von Klonen ohne ORF kann teilweise mit dem inhibitorischen Effekt des pIII (Fusions-) Proteins bei der Superinfektion mit dem Helferphagen erklärt werden (Li *et al.* 2002, Duenas und Borrebaeck, 1995). Dieses wurde in Expressionsanalysen überprüft. Anschließend wurden ausgewählte Klone sequenziert, um insbesondere mittels CDRH3-Sequenzvergleich eine Aussage über die Anreicherung von Klonen gleicher Sequenz machen zu können.

Das Ergebnis der PCR-Analyse (Tab. 3.8) zeigt, dass insgesamt Klone, die aus der ETH-2 Bank isoliert wurden, auch nach bis zu vier Selektionsrunden einen deutlich höheren Anteil vollständiger scFv Gene aufwiesen (Ausnahmen: SMP-Biotin Selektion), als solche aus der Griffin.1 Bank. Dieses ist sicherlich auf die unterschiedlichen Qualitäten der beiden Banken zurückzuführen (4.2). Die Anreicherung unvollständiger scFv-Gene im Zuge der SMP-Biotin Selektion (Tab. 3.8) könnte darauf zurückzuführen sein, dass die effiziente Infektion der verwendeten *E. coli* XL1 Zellen im Rahmen dieser Selektion ausgesprochen problematisch war. Dadurch zog sich der Panningprozess über einen deutlich längeren Zeitraum hin. Die scFv-Phagen mussten zudem mehrmals zwischengelagert werden. Dieses könnte frühe Mutationsereignisse begünstigt haben, die sich dann aufgrund des bestehenden Wachstumsvorteils dieser Klone (Tur *et al.* 2001) über den Verlauf der Selektion anreicherten.

Die Expressionsanalyse erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst als klassischer Expressionstest (2.4.15) aus Expressionskultur, SDS-PAA-Gelelektrophorese und Immunfärbung. Da sich dieses als zu zeit- und materialaufwändig herausstellte, wurde zu der sog. DOC-Methode (2.4.16) übergegangen. Die so durchgeführten Expressionsanalysen (Tab. 3.9) zeigten sehr stark variierende Prozentanteile exprimierbarer Klone, die bei den Klonen aus der ETH-2 Bank zwischen 7 % und 58 % lagen. Die 40 %, die für die Griffin.1 Klone erhalten wurden, sind aufgrund der geringen Probenzahl



statistisch nicht sehr relevant. Der geringe Anteil vollständiger Klone bei der Selektion an SiMAG TCI beads unter Verwendung der ETH-2 Bank (7 %) könnte auf die Verwendung des *E. coli* Stammes TG1 als Wirtsbakterium zurückzuführen sein. Dieser neigt aufgrund des nicht deletierten *recA* Gens stärker zu Rekombinationen als beispielsweise *E. coli* XL1. Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Selektionen der zuletzt genannte Bakterienstamm eingesetzt. Dennoch hatten die Anteile exprimierbarer scFv-Klone auch bei identischer Durchführung der Selektionen (SMP-Thiol, SMP-VBlink) eine hohe Schwankungsbreite. Dieses kann mit der Anzahl zur Selektion eingesetzter scFv-Phagen zusammenhängen. Mit dem Programm SPSS 12.0.1 wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson für die Exprimierbarkeit in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an scFvs berechnet und ergab bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p = 0,062$  einen Wert von  $-0,683$ . Für den Test wurde ein Signifikanzniveau von 5 % gewählt und es wurde zweiseitig getestet. Somit würde sich eine negative Korrelation zwischen der Expressionsfähigkeit und der Anzahl eingesetzter scFv-Phagen ergeben, die jedoch nicht signifikant sondern lediglich tendenziell ist. Um diese Aussage statistisch weiter abzusichern, müsste eine weitere Analyse mit einer höheren Anzahl an Fällen durchgeführt werden.

Die Sequenzanalyse ausgewählter scFv-Klone ergab für die Selektionen an SA- bzw. SMP-Biotin sowie an SMP-VBlink eine Anreicherung von scFv-Phagen mit gleicher CDRH3 Sequenz. Interessanterweise ist der affinste scFv, der im Rahmen dieser Arbeit isoliert wurde (SMP-VBlink 50) ein Klon, für den bei der Selektion zwei identische Klone identifiziert wurden (Tab. 3.10). Dieses unterstützt den Befund, dass im Rahmen dieser Selektion die Anreicherung spezifischer Klone erfolgte. Nichts desto trotz konnten die Sequenzen der beiden anderen aktiven Klone (SMP-ETHK1 und T-SMP-19) nicht mehrfach identifiziert werden. Für andere Selektionen, in denen eine Anreicherung einer oder weniger CDRH3 Sequenzen stattgefunden hatte (Tab. 3.10, SA-Biotin, SMP-Biotin), konnte darüber hinaus keine Spezifität nachgewiesen werden. Dieses ist im Einklang mit der Literaturlage, die belegt, dass die Anreicherung von Klonen gleicher Sequenz nicht notwendigerweise mit der Spezifität und Affinität der Fragmente korreliert (Wälchli *et al.* 2004). Es ist ebenso möglich,

dass eine Anreicherung von Klonen lediglich auf deren Wachstumsvorteile gegenüber anderen Klonen zurückzuführen ist.

#### **4.6 Expression des T-SMP-19 scFvs in *Nicotiana tabacum***

Hapten-spezifische Antikörperfragmente sind häufig von hohem diagnostischem, therapeutischem oder analytischem Interesse. So würden Sulfonamid-spezifische scFvs den sensitiven Nachweis von Sulfonamid-Kontaminationen im Rahmen der Lebens- und Futtermittelanalytik ermöglichen (1.1). Idealerweise werden diese Antikörper in einem hocheffizienten Expressionssystem produziert. Da transgene Pflanzen diesbezüglich entscheidende Vorteile besitzen (1.7), war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Etablierung eines Expressionssystems für rekombinante scFvs, welches auf transgenen Tabakpflanzen basiert. Der erste funktionale Antikörper wurde bereits 1989 basierend auf einem monoklonalen anti-P3 IgG1 in transgenem Tabak exprimiert (Hiatt *et al.* 1989). Es konnte eine Anreicherung von 1,3 % funktionalem Antikörper am Gesamt-Blattprotein gezeigt werden. Im Zuge der Weiterentwicklung rekombinanter Antikörper-Technologien wurden diese in unterschiedlichen Formaten (IgG, Fab, scFv) in transgenen Pflanzen exprimiert (De Wilde *et al.* 1996, Fischer *et al.* 1999b, Ma and Hein 1995, Schillberg *et al.* 1999). Auch Hapten-spezifische scFvs konnten bereits in transgenen Pflanzen exprimiert werden (Yuan *et al.* 2000). In pflanzlichen Expressionssystemen produzierte „single chain“ Antikörper haben nahezu die gleiche Affinität wie bakteriell produzierte (Bruyns *et al.* 1996). Auch für Hybridoma-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Spezifität und Affinität monoklonaler Antikörper erhalten bleiben kann, wenn sie in transgenen Pflanzen exprimiert werden (Voss *et al.* 1995).

Die Erstellung der Konstrukte zur *Agrobacterium*-vermittelten Transformation von *Nicotiana tabacum* erfolgte basierend auf dem binären Ti-Vektor pGII-229 aus der pGreen Vektorserie (Hellens *et al.* 2000a) (1.7).

Die Expression von scFvs im pflanzlichen Cytosol ist aufgrund sehr niedriger Expressionsraten häufig beschwerlich (Schouten *et al.* 1997). Durch die C-terminale Fusion eines KDEL-Retentions-Signals (Deneke *et al.* 1992, Wandelt *et al.* 1992), welches den Verbleib der Proteine im Endoplasmatischen Reticulum vermittelt, konnten die Ausbeuten an scFvs im Cytosol beträchtlich

gesteigert werden und erreichten Werte von bis zu 0,2 % des Gesamtproteingehalts der Pflanze (Schouten *et al.* 1996, Schouten *et al.* 1997). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde *Nicotiana tabacum* als pflanzliches Expressionssystem gewählt, da diese Pflanze relativ einfach und mit einem vergleichsweise geringen Zeitaufwand zu transformieren und zu regenerieren ist, schnelle Wachstumsraten aufweist und viel Blattmaterial produziert. Des Weiteren ist hinsichtlich einer „large scale“ Produktion von scFvs in transgenen Pflanzen interessant, dass sich durch die Verwendung samenspezifischer Promotoren und Signalsequenzen eine Akkumulation der scFvs im Samen erreichen lässt (Fiedler und Conrad, 1995, De Jaeger *et al.* 2002) und dass diese dort über lange Zeit stabil und funktional bleiben (Fiedler und Conrad, 1995). Da im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein Modellsystem entwickelt werden sollte, welches später für die Expression interessierender Antikörperfragmente zur Verfügung stehen sollte, wurden zunächst die beiden zuerst isolierten Antikörperfragmente SMP-14 und SMP-19 aus der Selektion an SMP-gekoppelten SiMAG CI beads (3.3.1) fusioniert mit der KDEL-Sequenz über *Xba*I und *Nco*I in den pGIIMH35S Vektor kloniert (Abb.3.14). Mit diesen Konstrukten wurde eine *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation von *N. tabacum* durchgeführt (2.2.10). Für eine PCR-Analyse wurde aus den primären Regeneraten genomische DNA isoliert (2.2.11). Die Regenerate wurden zu diesem Zeitpunkt auf MSZ-Medium mit 10 µg/ml PPT (pGII MH35S SMP-19 scFv) bzw. 5 µg/ml PPT (pGII MH35S SMP-14 scFv) kultiviert. Die Ergebnisse der mit vier unterschiedlichen Primerpaaren durchgeführten PCRs (3.6.1) zeigten zusammen mit der Tatsache, dass die Pflanzen bereits auf 10 bzw. 5 µg/ml Phosphinotricin kultiviert wurden, dass die T-DNA offenbar in das pflanzliche Genom integriert wurde. Das „gene of interest“ (*smp-14 scFv/smp-19 scFv*) konnte durch eine PCR mit T-DNA-spezifischen Primern (MH Green f1/MH Terminator) amplifiziert werden (Abb. 3.15). Darüber hinaus konnte weder das die bakterielle Resistenz vermittelnde *nptII*-Gen noch das pSoup Plasmid nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis unterstreicht, dass das nachgewiesene „gene of interest“ nicht aus noch in der Pflanze vorliegenden Agrobakterien stammen kann, sondern als Transgen in der genomischen DNA der Pflanze vorliegt. In einer sog. inversen PCR wurde weiterhin untersucht, ob in der genomischen DNA sog. „backbone junctions“ vorhanden sind. Dieses

gäbe einen ersten Aufschluss über die Anzahl möglicher integrierter T-DNA-Kopien. Ein Amplifikat von etwa 3 kb würde auf das Vorliegen einer „backbone junction“ und somit auf das Vorhandensein einer doppelten T-DNA Kopie hindeuten. Im vorliegenden Fall wurde kein Amplifikat dieser Größe erhalten, sondern lediglich mehrere Amplifikate geringerer Fragmentgröße, was auf unspezifische Bindungen der Primer an die genomische DNA zurückzuführen ist. Somit liegt lediglich eine einfache Kopie der T-DNA im pflanzlichen Genom vor, wobei dieses durch spätere „Southern Blot“ Analysen der T<sub>1</sub> bzw. T<sub>2</sub> verifiziert werden sollte. Um auf die Expressierbarkeit der rekombinanten scFvs zu analysieren, wurde aus Blattmaterial der T<sub>1</sub> der SMP-19 scFv Linie 01/03 eine native Proteinisolation durchgeführt (2.3.3) und der erhaltene Protein-Rohextrakt wurde über Ni-NTA IMAC basierend auf dem 6x His Tag des Proteins aufgereinigt. Der T-SMP-19 scFv konnte im Silbergel (Abb. 3.16) als ca. 32 kDa Fragment nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte das scFv-Fragment über seinen C-terminalen c-Myc- bzw 6x His-tag in einer Immunfärbung detektiert werden (Abb. 3.17). Damit war nachgewiesen, dass sich das scFv-Fragment T-SMP-19 in *N. tabacum* exprimieren lässt.

#### **4.7 Charakterisierung selektierter „single chain“ Fragmente**

##### **4.7.1 Oberflächenplasmonresonanzanalyse**

Die Charakterisierung selektierter scFv-Klone hinsichtlich ihrer Spezifität und Affinität erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit über Oberflächenplasmonresonanzanalysen an einem Biacore 3000 Gerät (2.6.1). Einer der beiden Interaktionspartner muss im Rahmen dieser Analyse an eine flexible hydrophile Carboxymethyldextran-Matrix der Sensorchipoberfläche immobilisiert werden (Ligand) während der zweite (Analyt) in einem kontinuierlichen Pufferstrom über die Chipoberfläche transportiert wird. Diese Carboxymethyldextran-Matrix ist speziell dazu entwickelt worden, unspezifische Interaktionen an der Chipoberfläche, wie sie bei unflexiblen hydrophoben Matrices auftreten, zu minimieren (Lofås und Johnsson 1990). Im vorliegenden Fall wurde der kleine Sulfonamid-Ligand für die Immobilisierung gewählt und die scFv-Proteine wurden als Analyten eingesetzt. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, verschiedene scFv-Klone am selben Chip zu analysieren. Darüber

hinaus war so eine orientierte Immobilisierung und Präsentation des Liganden möglich, die bei der Kopplung von Protein-Liganden nicht immer gegeben ist (Kortt *et al.* 1997). Zusätzlich ist die Verwendung von „small molecules“ als Analyten hinsichtlich der Sensitivität der Analyse kritisch (Mitchell *et al.* 2005). Die Immobilisierung der Liganden erfolgte wie in 2.7.2 beschrieben. Einer möglichen Verfälschung der gemessenen Assoziations- und Dissoziationsraten durch auftretende Massen-Transfer-Effekte (Kortt *et al.* 1997) wurde durch eine niedrige Immobilisierungsdichte und relativ hohe Flussraten (20 µl/min) während der Messung entgegengewirkt.

Der Immobilisierungserfolg der verwendeten Linker konnte durch die im Sensorgramm sichtbare Massenveränderung an der Sensorchipoberfläche nachgewiesen werden (3.7.2 und Abb.3.18). Zunächst wurden alle scFv-Klone, welche aus den Selektionen hervorgingen und für die eine Sequenz vorlag (Tab. 3.10) exprimiert, aufgereinigt und in der in 2.6.3 beschriebenen Weise hinsichtlich eines Bindungssignals am entsprechenden Sensorchip analysiert. Dabei wurden zunächst die Klone untersucht, für die eine Anreicherung hinsichtlich der auftretenden CDRH3 Sequenzen stattgefunden hatte, anschließend alle weiteren interessierenden Klone. Die im Rahmen der Selektionen an SA- bzw. SMP-Biotin isolierten Klone, die zum Teil eine sehr deutliche Anreicherung bestimmter CDRH3-Sequenzen aufwiesen (Tab. 3.10), zeigten in der Biacore-Analyse kein spezifisches Bindungssignal. Es ist nicht auszuschließen, dass durch die Selektion an Streptavidin-gekoppelten Mikrotiterplatten eine gewisse Anreicherung von Streptavidin-bindenden scFv-Phagen stattgefunden hat. Im Fall des SA-Biotins ist das Ausbleiben eines spezifischen Bindungssignals möglicherweise zusätzlich darauf zurückzuführen, dass das Sulfanilamid-Molekül mit seiner extremen strukturellen Einfachheit (Abb. 1.2) und seinem sehr geringen Molekulargewicht von 172,2 Da hinsichtlich seiner dadurch bedingten Antigenizität eine für den Einsatz im „Phage Display“ kritische Grenze unterschreitet. Nach Rodi *et al.* (2001) bilden Liganden mit einem Molekulargewicht von 300 Da oder mehr Interaktionen mit einer Aminosäuresequenz innerhalb des Protein-Interaktionspartners aus, die eine kontinuierliche Länge von mindestens 5 Aminosäureresten besitzt. Je geringer das Molekulargewicht, desto weniger Aminosäurereste sind an der

Ausbildung dieses Epitops beteiligt, was direkte Auswirkungen auf die initiale Bindung und die Stärke der Interaktionen hat.

Die Analyse der selektierten scFv-Klone ergab schließlich positive Bindungssignale für die drei scFv-Klone SMP-ETH K1 aus der Selektion an SMP-gekoppelten SiMAG TCI „beads“ (2.4.6 und 3.3.2), SMP-VBlink 50 aus der Selektion an dem Thiol-Linker Molekül SMP-VBlink (2.4.11 und 3.3.6) sowie dem aus Tabak isolierten T-SMP-19 scFv, der aus der Selektion an SMP-gekoppelten SiMAG CI „beads“ hervorging (2.4.4 und 3.3.1). Im Fall des SMP-VBlink 50 scFvs war die entsprechende CDRH3-Sequenz im Zuge der Selektion geringfügig angereichert worden (Tab. 3.10). Es wurde versucht, eine genauere Charakterisierung der genannten Klone hinsichtlich ihrer Spezifität und Affinität vorzunehmen. Für alle genannten und im Ergebnisteil dargestellten Messergebnisse kann eine mögliche unspezifische Bindung der Antikörperfragmente an die Carboxymethyldextran-Matrix der Sensorchip-Oberfläche oder das verwendete Linker-Molekül ausgeschlossen werden. Der Flusszelle, die für die eigentliche Messung verwendet wurde, wurde eine Flusszelle vorgeschaltet, deren Oberfläche in gleicher Weise aktiviert, als Referenz (ohne Sulfonamid) derivatisiert und anschließend deaktiviert wurde (3.7.1 und 3.7.2). Alle resultierenden Sensorgramme wurden Referenz-subtrahiert dargestellt. Für Hapten-spezifische scFvs, die aus synthetischen „single pot“ Banken hervorgehen, kann in Abhängigkeit von der Größe, der Diversität und dem zugrunde liegenden Antikörpergenmaterial der Bank eine Dissoziationskonstante im mikromolaren (Marks et al. 1991) bis maximal nanomolaren Bereich erreicht werden (Griffith *et al.* 1994, Moghaddam *et al.* 2001).

### **SMP-ETH K1 scFv**

Der SMP-ETH K1 scFv wurde an einem SMP-Thiol (Graffinity) gekoppelten CM5 Chip vermessen (3.7.2). Die kinetischen Messungen erfolgten in einem Konzentrationsbereich von 17,9 nM bis 1,8  $\mu$ M. Da der Klon aus der ETH-2 Bank hervorging und somit in der schweren Kette das zu den V<sub>H</sub>3-Domänen zählende DP-47 Segment vorlag, sollte das Antikörperfragment als Monomer vorliegen (Ewert *et al.* 2003). Für die Berechnung der Bindungskonstanten wurde daher das 1:1 Langmuir Bindungsmodell verwendet. Die

Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) ergab einen Wert von  $1.5 \times 10^{-6}$  M und lag damit im unteren Bereich der für Hapten-spezifische scFvs erhaltenen Affinitäten. Aus Abb. 3.19 A ist zu entnehmen, dass das scFv-Fragment mit Beendigung der Injektion und Einsetzen des kontinuierlichen Pufferstroms sehr schnell dissoziiert, das heißt die Stabilität der Bindung nicht sehr hoch ist. In der verwendeten ETH-2 Bank sind die CDR1 und 2 Regionen der leichten und schweren Ketten nicht mutagenisiert. Diese Regionen, bei Hapten-Bindern insbesondere die CDRL1 zusammen mit „framework“ Regionen an der  $V_L/V_H$ -Schnittstelle, scheinen jedoch ebenfalls maßgeblich an der Bindung des Antigens und der Stabilisierung dieser Bindung beteiligt zu sein (Ewert *et al.* 2004). Daher sollte durch nachträgliche Mutagenese dieser Regionen und eine erneute Selektion auf SMP-spezifische scFv-Phagen die Affinität und Stabilität der Bindung der resultierenden scFvs gesteigert werden können.

Eine Kompetition mit dem freien Sulfonamid konnte für den SMP-ETH K1 Klon nicht erreicht werden, was darauf schließen lässt, dass die Bindung im vorliegenden Fall nicht ausschließlich in 1:1 Stöchiometrie an das SMP erfolgt. Dies kann auf weitere unspezifische Wechselwirkungen des Fragmentes mit der Chipoberfläche oder einer partiellen Denaturierung an ebendieser zurückzuführen sein.

### **SMP-VBlink 50 scFv**

Die kinetischen Messungen für den SMP-VBlink 50 scFv erfolgten an einem SMP-VBlink gekoppelten CM5 Chip in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 500 nM (3.7.3). Die Dissoziationskonstante berechnete sich mit  $7.74 \times 10^{-8}$  M und lag damit im oberen Bereich der für Hapten-spezifische scFvs bislang erhaltenen Affinitäten (Clackson *et al.* 1991). Eine Kompetition mit freiem Sulfamethoxypyridazin konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die Präinkubation des Antikörperfragmentes mit bis zu 1  $\mu$ M ( $10^{-6}$  M) SMP führte zu einer sukzessiven Reduktion des Bindungssignals von 45 auf ca. 30 RU (Abb. 3.21). Somit wird durch den SMP-VBlink 50 scFv nicht nur die derivatisierte, sondern auch die freie Form des Haptens erkannt. Dies zeigt eindeutig, dass ein inverser Bindungsmechanismus über das Konjugat ausgeschlossen werden kann und belegt, dass mit diesem Ansatz ein Sulfonamid-spezifisches

Antikörperfragment generiert werden konnte, das wesentliche Anforderungen für einen Einsatz in der Diagnostik erfüllt.

Kompetitionsexperimente mit anderen Sulfonamiden könnten weiteren Aufschluss über die Spezifität des SMP-VBlink 50 scFvs geben. Da im SMP-VBlink Konjugat die Sulfonamid-spezifische funktionelle Gruppe durch eine veränderte Kopplungschemie erhalten blieb, ist eine Kreuzreaktivität des Antikörperfragmentes mit anderen Sulfonamiden möglich. Da beide SMP-Thiol Linker im Verlauf der Arbeit in zunehmenden Maße oxidiert vorlagen und eine erneute Reduktion der Verbindungen nicht möglich war, konnten zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit keine brauchbaren SMP-gekoppelten Sensor-Chips mehr hergestellt werden. Aus diesem Grund konnten im Rahmen dieser Arbeit die genannten Experimente nicht mehr durchgeführt werden.

### **T-SMP-19 scFv**

Der SMP-19 scFv wurde nach nativer Isolation aus *N. tabacum* (3.6.2) an einem SMP-Thiol- (Graffinity) gekoppelten CM5-Chip in einem Konzentrationsbereich von 50 bis 500 nM vermessen (3.7.4). Aus den resultierenden Sensorgrammen (Abb. 3.22) geht hervor, dass der Antikörper in den unteren Konzentrationsbereichen (bis etwa 100 bis 200 nM) im Vergleich zu den darüber liegenden Konzentrationsbereichen ein signifikant unterschiedliches Bindungsverhalten vor allem hinsichtlich des Verlaufs der Assoziation zeigt. Berücksichtigt man, dass dieses Antikörperfragment aus der Griffin.1 Bank isoliert wurde, welche sich in der V<sub>H</sub>-Region aus insgesamt 49 verschiedenen V<sub>H</sub>-Segmenten (Nissim *et al.* 1994, Tomlinson *et al.* 1992) zusammensetzt, für die eine Assoziationsneigung zum Teil nicht auszuschließen ist, wäre eine wahrscheinliche Begründung für dieses heterogene Bindungsverhalten das Vorliegen eines scFv-Monomer-Dimer-Gemisches. Die Analyse der Messdaten war unter Verwendung eines Bindungsmodells für „Heterogenous analyte (competing reactions)“ möglich. Eine Dissoziationskonstante konnte demnach nicht bestimmt werden. Folgeexperimente wie die Analyse des aus *E. coli* aufgereinigten SMP-19 scFv Fragmentes sowie der monomeren scFv Fraktion konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden, da aus den oben genannten Gründen keine geeigneten Sensor-Chips mehr hergestellt werden konnten.



#### 4.7.2 Sequenzvergleich

Da die CDRH3 Region unter den Komplementaritäts-determinierenden Regionen die größte Variabilität aufweist (Seal *et al.* 2000, Shirai *et al.* 1996, Shirai *et al.* 1999) und zusammen mit der CDRL3 maßgeblich an der initialen Bindung an das Antigen beteiligt ist (Padlan *et al.* 1994), wurden zunächst insbesondere diese Regionen basierend auf ihrer Aminosäuresequenz miteinander verglichen. In der Natur variieren die Längen der CDR3 Regionen zwischen wenigen und bis zu 25 Aminosäureresten. Dabei scheinen Hapten-bindende Antikörperfragmente zu kürzeren CDR3 Regionen zu tendieren als Protein-bindende (Griffith *et al.* 1994). Die ETH-2 Bank ist für kürzere CDR3 Regionen optimiert, unter anderem weil resultierende Antikörperfragmente eine höhere Stabilität gegenüber Proteolyse und in *E. coli* höhere Expressionsraten aufweisen (Pini *et al.* 1998). Bei dem in Abb. 3.23 dargestellten Vergleich der CDRH3 und CDRL3 Regionen der drei Klone T-SMP-19, SMP-ETH K1 und SMP-VBlink 50 sowie eines nicht-bindenden Klons SMP-VBlink 15 fällt in der CDRH3 Region des Klons mit der niedrigsten Dissoziationskonstante (SMP-VBlink 50) eine nahezu symmetrische Aufteilung in einen polaren und einen unpolaren Teil und ein 1:1 Verhältnis von polaren zu unpolaren Aminosäuren auf. In der CDRL3 Region dieses und des SMP-ETH K1 Klons gibt es im Vergleich zu den anderen Klonen eine deutliche Verschiebung hin zu polaren Aminosäuren, aber wiederum eine klare Trennung der Sequenz in einen polaren und einen unpolaren Teil, jedoch in der umgekehrten Orientierung wie beim SMP-VBlink 50 CDRH3. Möglicherweise stellen diese polaren Aminosäurereste potentielle Interaktionsstellen für die polaren Bereiche des SMP-Moleküls dar.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der CDRH3 Regionen aller aus der ETH-2 Bank isolierten Klone ergab eine Gruppe von 5 Klonen, deren CDRH3 Sequenz identisch bzw. hochgradig ähnlich war (Abb. 3.24). Darunter befand sich der im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisierte SMP-VBlink 50 Klon, der die besten SMP-bindenden Eigenschaften der untersuchten Klone aufwies. Dieses legt nahe, dass eine CDRH3-Sequenz, die der des SMP-VBlink 50 Klons nahe kommt (GVGAFRPYRKHE) ein SMP-bindendes Motiv darstellt. Die anderen Klone dieser Gruppe entstammten einerseits ebenfalls der SMP-VBlink Selektion. Andererseits gingen sie aus der Selektion an dem anderen

SMP-Thiol Linker (Graffinity) hervor. Hieraus lässt sich eine deutliche Eignung der beiden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten SMP-Thiol-Linker Konjugate (SMP-VBlink und SMP-Thiol) für die Selektion SMP-spezifischer scFv-Antikörper ableiten. Da beide Linker unterschiedliche physiko-chemische Eigenschaften aufwiesen und das SMP zudem über unterschiedliche funktionelle Gruppen an diese gekoppelt wurde, kann weiterhin belegt werden, dass die SMP-Bindung über das genannte Bindungsmotiv unabhängig von der Orientierung des SMPs am Linker und weitgehend unabhängig vom Linker selbst erfolgt.

#### 4.8 Modellierung der 3D-Struktur SMP-bindender scFvs

Mithilfe eines „Threadings“ basierend auf dem WAM-Algorithmus (2.8) wurde die 3D-Struktur SMP-bindender scFvs (T-SMP-19, SMP-ETH K1 und SMP-VBlink 50) berechnet. Die Ergebnisse ließen die Beschreibung putativer Bindungstaschen zu, welche unter anderem durch die CDR3 Regionen der leichten und schweren Kette ausgebildet werden (Padlan 1994) (Abb. 3.26, 3.27 und 3.28). Diese putativen Bindungstaschen bildeten insgesamt schmale Kavitäten aus, die, berücksichtigt man die Dimension des SMP-Moleküls (2,49 x 12,50 Å), eine interne Bindung des SMPs erlauben würden. Die Literaturlage belegt, dass Hapten-Binder gewöhnlich eine tiefe trichterförmige Bindungstasche ausbilden, während Protein-Binder eine eher flache antigenbindende Oberfläche besitzen (Ewert *et al.* 2004). Die CDR3 Regionen der leichten und schweren Kette der drei genannten Klone unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Aminosäurezusammensetzung und deren Verteilung über die CDRs beträchtlich (Abb. 3.23). Antikörper-Antigen Komplexe werden generell über nicht kovalente Interaktionen wie Van der Waals Kräfte, Wasserstoffbrücken, hydrophobe Interaktionen und gelegentlich über Ionen-Paarungen stabilisiert (Braden and Poljak 1995). Bei Protein-Antigenen treten normalerweise 12-20 Antikörper-Aminosäurereste über eine interne molekulare Oberfläche von über 600-900 Å mit dem Antigen in Kontakt (Dougan *et al.* 1998). Für kleine Moleküle ist es wahrscheinlich, dass diese nur mit sehr wenigen Aminosäuren der Bindungstasche (~ 5 bis 6 Reste) in direkte Interaktion treten (Rodi *et al.* 2001). Durch die geringe Anzahl an

Interaktionsmöglichkeiten, die ein kleines Molekül verglichen mit einem Protein-Antigen ausbilden kann, ist die Stärke der Interaktion zwischen einem kleinen Molekül und seinem Bindungspartner per se bedeutend schwächer als es bei Protein-Protein-Interaktionen der Fall ist (Rodi *et al.* 2001). Für kleine Moleküle scheint das Ausmaß der Hydrophobizität der Bindungstasche sowie deren Oberflächenstruktur entscheidend für die Bindungsmöglichkeiten zu sein (Rodi *et al.* 2001). Je „rauher“ die Oberflächenstruktur desto stärker erhöht sich die Oberfläche eines definierten Volumens und desto mehr Möglichkeiten zur Ausbildung nicht-ionischer Wechselwirkungen gibt es (Rodi *et al.* 2001). Insgesamt scheinen aromatische Aminosäuren der CDR Regionen wie Tyrosin (Y), Tryptophan (W) und Phenylalanin (F) entscheidend in der Interaktion mit dem Antigen involviert zu sein (Braden and Poljak 1995, Davies and Cohen 1996, Padlan 1994). In den CDR3 Sequenzen der Klone T-SMP-19, SMP-ETH K1 und SMP-VBlink 50 (Abb. 3.23) fällt insbesondere auf, dass für den besten SMP-Binder SMP-VBlink 50 (3.7.3) die Verteilung der Aminosäurereste deutlich stärker zu unpolaren Resten tendiert als in allen anderen Klonen, in welchen die polaren Aminosäuren häufig überwiegen. An der Ausbildung der putativen Bindungstasche des VBlink 50 Klons scheinen jedoch vor allem in der leichten Kette auch viele polare Aminosäurereste beteiligt zu sein, welche möglicherweise potentielle Interaktionspartner für die polaren Teile des SMP-Moleküls wie beispielsweise die Sulfofunktion darstellen. Der Anteil der aromatischen Aminosäuren liegt in der CDRH3 des SMP-VBlink 50 Klons höher als in den anderen CDRH3 Sequenzen. Insgesamt erscheint die Struktur der putativen Bindungstasche des SMP-VBlink 50 Klons sehr kompakt und in stärkerem Maß durch die anderen CDR Regionen insbesondere der leichten Kette sowie „framework“ Regionen stabilisiert (Abb. 3.27).

#### 4.9 Abschlussdiskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich ein „single chain“ Antikörper (scFv) gegen Sulfamethoxypyridazin (SMP) entwickelt werden. Oberflächenplasmonresonanzanalysen zeigten, dass dieser Antikörper mit hoher Affinität ( $K_D$  von  $7.74 \times 10^{-8}$  M) an SMP bindet und diese Bindung durch freies SMP kompetierbar ist. Damit sind wesentliche Voraussetzungen für einen

Einsatz dieses Antikörpers für die SMP-Detektion im Rahmen der Lebensmittelanalyse erfüllt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass ein zentraler Punkt für die erfolgreiche Selektion Hapten-spezifischer scFvs die Qualität und Diversität der verwendeten Antikörpergenbibliothek ist. Idealerweise sollte sie möglichst selten reamplifiziert werden, um den Anteil funktionaler Antikörpergene hoch zu halten. Die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete ETH-2 Bibliothek setzte sich aus V-Gensegmenten zusammen, deren biophysikalische Eigenschaften einer erfolgreichen Selektion und Charakterisierung antigen-spezifischer „single chain“ Fragmente zuträglich waren. Des Weiteren konnte so gezeigt werden, dass eine Diversität, wie sie in der semisynthetischen „single framework“ Bibliothek ETH-2 vorhanden war, ausreichte, um daraus auf direktem Weg ein Hapten-spezifisches Antikörperfragment mit hoher Affinität zu isolieren.

Als wesentlicher Erfolgsfaktor stellte sich dabei die Präsentation des Haptens über einen langen, flexiblen Linker dar. Dieses ermöglichte den Ausschluss des aus der Literatur bekannten Problems der bevorzugten Selektion sog. „interface binders“.

Über die Charakterisierung des SMP-VBlink 50 Klon und umfassende CDRH3 Sequenzvergleiche konnte ein SMP-Bindungsmotiv entdeckt werden (4.7). Klone die dieses Motiv aufwiesen, resultierten aus den Selektionen an langen, flexiblen Thiol-Linker Molekülen, was die Eignung dieser Linker für die Selektion auf Hapten-spezifische Antikörperfragmente unterstreicht.

Die spezifischen Bindungsdaten, die für zwei weitere Klone erhalten werden konnten, welche aus Selektionen an SMP-gekoppelten „magnetic beads“ hervorgingen, belegen eine prinzipielle Eignung dieses Systems für die Selektion Hapten-spezifischer Antikörperfragmente. Sicherlich sind die hier vorhandenen Linker-Moleküle noch zu optimieren, um eine besser geeignete Präsentation der Haptene zu erreichen.

Die Immobilisierung der Sulfonamid-Biotin-Konjugate über Streptavidin hat sich aufgrund des hohen Hintergrundes unspezifischer Antikörperfragmente, die so selektiert wurden, als weniger geeignet für die Immobilisierung sehr kleiner Liganden herausgestellt.

Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich ein Modellsystem für die Expression rekombinanter „single chain“ Antikörper in transgenen Pflanzen entwickelt werden. Dieses sollte in Zukunft die Produktion spezifischer Antikörperfragmente in großem Maßstab möglich machen.

#### 4.10 Ausblick

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierte SMP-VBlink 50 scFv weist mit einer  $K_D$  von  $7.74 \times 10^{-8}$  M und seiner Kompetierbarkeit mit freiem SMP gute Eigenschaften für die spezifische Detektion von Sulfamethoxypyridazin im Rahmen der Lebensmittelanalyse auf. Zur weiteren Optimierung bieten sich verschiedene Strategien an. Zum einen können, die weiteren vier verschiedenen Klone, welche das SMP-Bindungsmotiv aufweisen, exprimiert, charakterisiert und die 3D-Struktur berechnet werden. Die erhaltenen Dissoziationskonstanten, Modelle und Daten über ihre Kreuzreaktivität mit anderen Sulfonamiden, könnten wichtige Rückschlüsse über Aminosäurereste zulassen, die für eine spezifische Bindung an das Antigen entscheidend sind. Idealerweise lässt sich so ein erstes Modell der SMP-scFv-Interaktion darstellen.

Zum anderen besteht die Möglichkeit die Affinität des Antikörpers sowie die Stabilität der Bindung über eine PCR-basierte Mutagenese der CDR 1 und 2 sowie ausgewählter „framework“ Regionen zu verbessern. Wesentliche Vorarbeiten hierzu sind bereits unternommen worden.

Das in dieser Arbeit entwickelte *N. tabacum* basierte Expressionssystem für rekombinante scFvs steht prinzipiell für die Expression aller selektierten Antikörperfragmente zur Verfügung. Die Aufreinigung und der Nachweis des rekombinanten Proteins war möglich. Weitere Analysen der bestehenden SMP-19 scFv Linien sollten vor allem unter dem Gesichtspunkt der zu erwartenden Ausbeuten an rekombinantem Protein durchgeführt werden, um ggf. ein „up-scale“ für die Produktion des SMP-VBlink 50 scFv in großem Maßstab durchführen zu können.

## 5. Literatur

**Albers, C., Lehr, M., Beike, J., Köhler, H. and Brinkmann, B. (2002).** Synthesis of a psilocin hapten and a protein-hapten conjugate. *J. Pharm. Pharmacol.*, 54, 1265-1270

**Amstutz, P., Forrer, P., Zahnd, C. and Plückthun A. (2001).** In vitro display technologies: novel developments and applications. *Current Opinions in Biotechnology*, 12, 400-405

**Barbas III, C.F., Amberg, W., Simoncsits, A., Jones, T.M. and Lerner, R.A. (1993).** Selection of human anti-hapten antibodies from semisynthetic libraries. *Gene*, 137, 57-62

**Barnes, C.J., Guyer, C.G., Geleta, J.N., Matusik, J.E., Weber, J.D., Frank, L.R. and Morris, G.L. (1990).** Comparative depletion of sulfamethazine in bob veal, fancy veal, and replacement calves. *J. Food Prot.*, 53, 154-157

**Barbas III, C.F., Kang, A.S., Lerner, R.A. and Benkovic, S.J. (1991).** Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7978-7982

**Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.-M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S. and Whitlow, M. (1988).** Single-Chain Antigen-Binding Proteins. *Science*, 242, 423-426

**Blum, M., Beier, H. und Gross, H.J. (1987).** Verbesserte Silberfärbung von Pflanzenproteinen, RNA und DNA in Polyacrylamidgelen. *Elektrophoresis*, 8, 93-99

**Boder, E.T. and Wittrup, K.D. (1997).** Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nature Biotechnology*, 15, 553-557

**Boeke, J.D. and Model, P. (1982).** A prokaryotic membrane anchor sequence: Carboxyl terminus of bacteriophage f1 gene *III* protein retains in the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 5200-5204

**Bracci, L., Pini, A., Lozzi, L., Lelli, B., Battestin, P., Spreafico, A., Bernini, A., Niccolai, N. and Neri, P. (2001).** Mimicking the nicotinic receptor binding site by a single chain Fv selected by competitive panning from a synthetic phage library. *Journal of Neurochemistry*, 78, 24-31

**Bradbury, A., Velappan, N., Verzillo, V., Ovecká, M., Chasteen, L., Sblattero, D., Marzari, R., Lou, J., Siegel, R. and Pavlik, P. (2003).** Antibodies in proteomics I: generating antibodies. *TRENDS in Biotechnology*, 21 (6), 275-281

**Braden, B.C. and Poljak, R.J. (1995).** Structural features of the reactions between antibodies and protein antigens. *FASEB Journal*, 9, 9-16

**Braunagel, M. and Little, M. (1997).** Construction of a semisynthetic antibody library using trinucleotide oligos. *Nucleic Acids Research*, 25 (22) 4690-4691

**Breitling, F. und Dübel, S. (1997).** Rekombinante Antikörper. Spektrum Akademischer Verlag

**Bruce, M.P., Boyd, V., Duch, C. and White, J.R. (2002).** Dialysis-based bioreactor systems for the production of monoclonal antibodies – alternatives to ascites production in mice. *Journal of Immunological Methods*, 264, 59-68

**Bruyns, A.-M., De Jaeger, G., De Neve, M., De Wilde, C., Van Montagu, M. and Depicker, A. (1996).** Bacterial and plant-produced scFv proteins have similar antigen-binding properties. *FEBS Letters*, 386, 5-10

**Burmester, J., Spinelli, S., Pugliese, L., Krebber, A., Honegger, A., Jung, S., Schimmele, B., Cambillau, C. and Plückthun, A. (2001).** Selection, Characterization and X-ray Structure of Anti-ampicillin Single-chain Fragments from Phage-displayed Murine Antibody Libraries. *Journal of Molecular Biology*, 309, 671-685

**Cárcamo, J., Ravera, M.W., Brissette, R., Devoda, O., Beasley, J.R., Alam-Moghé, A., Wan, C., Blume, A. and Mandecki, W. (1998).** Unexpected frameshifts from gene to expressed protein in a phage-displayed peptide library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 11146-11151

**Chan, E.C.Y. and Ho, P. (2002).** Preparation and characterization of immunogens for antibody production against metanephrine and normetanephrine. *Journal of Immunological Methods*, 266, 143-154

**Charlton, K., Harris, W.J., Porter, A.J. (2001).** The isolation of super-sensitive anti-hapten antibodies from combinatorial antibody libraries derived from sheep. *Biosensors & Bioelectronics*, 16, 639-646

**Chu, L. and Robinson, D.K. (2001).** Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 180-187

**Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffith, A.D. and Winter, G. (1991).** Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, 352, 624-628

**Cliquet, P., Cox, E., Haasnoot, W., Schacht, E. and Goddeeris, B. M. (2003).** Generation of Group-Specific Antibodies against Sulfonamides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5835-5842

**Courtney, B.C., Williams, K.C. and Schlager, J.J. (1995).** A phage display vector with improved stability, applicability and ease of manipulation. *Gene*, 165, 139-140



**Cox, J.P.L., Tomlinson, I.M. and Winter, G. (1994).** A directory of human germ-line V $\kappa$  segments reveals a strong bias in their usage. *European Journal of Immunology*, 24, 827-836

**Cullen, D.C., Brown, R.G.W. and Lowe, C.R. (1987).** Detection of Immuno-complex Formation via Surface Plasmon Resonance on Gold-coated Diffraction Gratings. *Biosensors*, 3, 211-225

**Daniell, H., Streatfield, S.J. and Wycoff, K. (2001).** Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *TRENDS in Plant Science*, 6 (5), 219-226

**Daugan, D.A., Malby, R.L., Gruen, L.C., Kortt, A.A. and Hudson, P.J. (1998).** Effects of substitutions in the binding surface of an antibody on antigen affinity. *Protein Engineering*, 11 (1), 65-74

**Daugherty, P.S., Chen, G., Iverson, B.L. and Georgiou, G. (2000).** Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 97 (5), 2029-2034

**Daugherty, P.S., Chen, G., Olsen, M.J., Iverson, B.L. and Georgiou, G. (1998).** Antibody affinity maturation using bacterial surface display. *Protein Engineering*, 11 (9), 825-832

**Davies, D.R. and Cohen, G.H. (1996).** Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 7-12

**De Block, M., Herrera-Estrella, L., van Monzagu, M., Schell, J. and Zambryski, P. (1984).** Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. *EMBO Journal*, 3, 1681-1689

**De Bruin, R., Spelt, K., Mol, J., Koes, R. and Quattrocchio, F. (1999).** Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nature Biotechnology*, 17, 397-399

**De Haard, H.J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S.E., Roovers, R.C., Henderikx, P., de Bruin, A.P., Arends, J.W. and Hoogenboom, H.R. (1999).** A Large Non-immunized Human Fab Fragment Phage Library That Permits Rapid Isolation and Kinetic Analysis of High Affinity Antibodies. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (26), 18218-18230

**De Jaeger, G., Scheffer, S., Jacobs, A., Zambre, M., Zobell, O., Goossens, A., Depicker, A. and Angenon, G. (2002).** Bosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nature Biotechnology*, advance online publication, 4 November 2002, pp. 1-4

**Denecke, J., De Rycke, R. and Botterman, J. (1992).** Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. *The EMBO Journal*, 11 (6), 2345-2355

**De Wilde, C., De Neve, M., De Rycke, R., Bruyns, A.M., De Jaeger, G., Van Montagu, M., Depicker, A. and Engeler, G. (1996).** Intact antigen-binding MAK33 antibody and Fab fragment accumulate in intercellular spaces of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 114, 233-241

**Dickopf, S., Frank, M., Junker, H.D., Maier, S., Metz, G., Ottleben, H., Rau, H., Schellhaas, N., Schmidt, K., Sekul, R., Vanier, C., Vetter, D., Czech, J., Lorenz, M., Matter, H., Schudok, M., Schreuder, H., Will, D.W. and Nestler, H.P. (2004).** Custom chemical microarray production and affinity fingerprinting for the S1 pocket of factor VIIa. *Analytical Biochemistry*, 335 (1), 50-57

**Duenas, M. and Borrebaeck, C.A. (1995).** Novel helper phage design: intergenic region affects the assembly of bacteriophages and the size of antibody libraries. *FEMS Microbiol. Letters*, 125, 317-321

**Einhauer, A. and Jungbauer, A. (2001).** The FLAG<sup>TM</sup> peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 49, 455-465

**Engel, M.F.M. (2004).** Detailed Characterization of Adsorption-Induced Protein Unfolding. Dissertation, Laboratory of Biochemistry, University of Wageningen

**EU** regulation no. 508/1999, L60(9-3-1999), 1999, pp 16-52

**Ewert, S., Huber, T., Honegger, A. and Plückthun, A. (2003).** Biophysical Properties of Human Antibody Variable Domains. *Journal of Molecular Biology*, 325, 531-553

**Ewert, S., Honegger, A. and Plückthun, A. (2004).** Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. *Methods*, 34, 184-199

**Fiedler, U. and Conrad, U. (1995).** High-Level Production and Long-Term Storage of Engineered Antibodies in Transgenic Tobacco Seeds. *Bio/Technology*, 13, 1090-1093

**Fischer, R., Liao, Y.-C., Hoffmann, K., Schillberg, S. and Emans, N. (1999a).** Molecular Farming of Recombinant Antibodies in Plants. *Biological Chemistry*, 380, 825-839

**Fischer, R., Schumann, D., Zimmermann, S., Drossard, J., Sack, M. and Schillberg, S. (1999b).** Expression and characterization of bispecific single-chain Fv fragments produced in transgenic plants. *European Journal of Biochemistry*, 262, 810-816

**Franco, D.A., Webb, J. and Taylor, C.E. (1990).** Antibiotic and sulfonamide residues in meat: implication for human health. *J. Food Prot.*, 53, 178-185

**Gaskin, D.J.H., Starck, K., Turner, N.A. and Vulfson, E.N. (2001).** Phage display combinatorial libraries of short peptides: ligand selection for protein purification. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 766-772

**Goldman, E., Korus, M. and Mandecki, W. (2000).** Efficiencies of translation in three reading frames of unusual non-ORF sequences isolated from phage display. *FASEB Journal*, 14, 603-611

**Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A. and Kuby, J. (2003).** Immunology. Fifth Edition. W.H. Freeman and Company, New York

**Griffith, A.D., Malmquist, M., Marks, J.D., Bye, J.M., Embleton, M.J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K.P., Gorick, B.D., Hughes-Jones, N.C., Hoogenboom, H.R. and Winter, G. (1993).** Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *The EMBO Journal*, 12 (2), 725-734

**Griffith, A.D., Williams, S.C., Hartley, O., Tomlinson, I.M., Waterhouse, P., Crosby, W.L., Kontermann, R.E., Jones, P.T., Low, N.M., Allison, T.J., Prospero, T.D., Hoogenboom, H.R., Nissim, A., Cox, J.P.L., Harrison, J.L., Zaccolo, M., Gherardi, E. and Winter, G. (1994).** Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *The EMBO Journal*, 13 (14), 3245-3260

**Haasnoot, W., Cazemier, G., Du Pré, J., Kemmers-Voncken, A., Bienenmann-Ploum, M. and Verheijen, R. (2000).** Sulfonamide Antibodies: From Specific Polyclonals to Generic Monoclonals. *Food and Agricultural Immunology*, 12, 15-30

**Hanes, J. and Plückthun, A. (1997).** *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4937-4942

**Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S. and Mullineaux, P.M. (2000a).** pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 42, 819-832

**Hellens, R.P., Mullineaux, P.M. and Klee, H. (2000b).** A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, 5, 446-451

**Hiatt, A., Cafferkey, R. and Bowdish, K. (1989).** Production of antibodies in transgenic plants. *Nature*, 342, 76-78

**Hiatt, A. and Ma, K.-C. (1992).** Monoclonal antibody engineering in plants. *FEBS Letters*, 307 (1), 71-75

**Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989).** Site-directed mutagenesis by overlap extension PCR. *Gene*, 77, 51

**Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Hoekema, A. (1993).** New *Agrobacterium* helper plasmids for transfer to plants. *Transgenic Research*, 2, 208-218

**Hoogenboom, H.R. (1997).** Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends in Biotechnology*, 15, 62-70

**Hoogenboom, H.R., Marks, J.D., Griffith, A.D. and Winter, G. (1992).** Building Antibodies from their Genes. *Immunological Reviews*, 130, 41-68

**Hoogenboom, H.R. and Winter, G. (1992).** By-passing Immunisation. Human Antibodies from Synthetic Repertoires of Germline VH Gene Segments Rearranged *in Vitro*. *Journal of Molecular Biology*, 227, 381-388

**Horsch, R.B., Fraley, R.T., Rogers, S.G., Sanders, P.R., Lloyd, A. and Hoffmann, N. (1984).** Inheritance of functional genes in plants. *Science*, 223, 496-498

**Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N., Eicholz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T. (1985).** A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227, 1229-1231

**Hust, M. (2002).** Rekombinante Antikörper gegen die Nla-Protease des *Plum pox virus*. Dissertation am Lehrgebiet Molekulargenetik, Universität Hannover

**Hust, M. and Dübel, S. (2004).** Mating antibody phage display with proteomics. *TRENDS in Biotechnology*, 22 (1), 8-14

**Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett, H.M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Bruccoleri, R.E., Haber, E., Crea, R. and Oppermann, H. (1988).** Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5879-5883

**Jacobsson, K. and Frykberg, L. (1996).** Phage display shot-gun cloning of ligand-binding domains of prokaryotic receptors approaches 100 % correct clones. *BioTechniques*, 20, 1070-1081

**Janeway, C.A. und Travers, P. (1997).** Immunologie, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag

**Jönsson, U., Fägerstam, L., Ivarsson, B., Johnsson, B., Karlsson, R., Lundh, K., Löfås, S., Persson, B., Roos, H., Rönnberg, I., Sjölander, S., Stenberg, E., Ståhlberg, R., Urbaniczky, C., Östlin, H. and Malmquist, M. (1991).** Real-Time Biospecific Interaction Analysis Using Surface Plasmon Resonance and a Sensor Chip Technology. *BioTechniques*, 11 (5), 620-627

**Johnsson, B., Löfås, S. and Lindquist, G. (1991).** Immobilization of Proteins to a Carboxymethyldextran-Modified Gold Surface for Biospecific Interaction Analysis in Surface Plasmon Resonance Sensors. *Analytical Biochemistry*, 198, 268-277

**Johnsson, B., Löfås, S., Lindquist, G., Edström, Å., Müller Hillgren, R.-M. and Hansson, A. (1995).** Comparison of Methods for Immobilization to Carboxymethyl Dextran Sensor Surfaces by Analysis of Specific Activity of Monoclonal Antibodies. *Journal of Molecular Recognition*, 8, 125-131

**Jørgensen, T.Ø., Solem, S.T., Espelid, S., Warr, G.W., Brandsdal, B.O., Smalås, A. (2002).** The antibody site in Atlantic salmon; phage display and modeling of scFv with anti-hapten binding ability. *Developmental and Comparative Immunology*, 26, 201-206

**Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhofer, G., Hoess, A., Wölle, J., Plückthun, A. and Virnekäs, B. (2000).** Fully Synthetic Human Combinatorial Antibody Libraries (HuCAL) Based on Modular Consensus Frameworks and CDRs Randomized with Trinucleotides. *Journal of Molecular Biology*, 296, 57-86

**Kodadek, T., Reddy, M.M., Olivos, H.J., Bachhawat-Sikder, K. and Alluri, P.G. (2004).** Synthetic Molecules as Antibody Replacements. *Accounts of Chemical Research*, 37 (9), 711-718

**Köhler, G. and Milstein, C. (1975).** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-497

**Korpimäki, T., Rosenberg, J., Virtanen, P., Karskela, T., Lamminmäki, U., Tuomola, M., Vehniäinen, M. and Saviranta, P. (2002).** Improving Broad Specificity Hapten Recognition with Protein Engineering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4194-4201

**Korpimäki, T., Rosenberg, J., Virtanen, P., Lamminmäki, U., Tuomola, M., and Saviranta, P. (2003).** Further improvement of broad specificity hapten recognition with protein engineering. *Protein Engineering*, 16 (1), 37-46

**Korpimäki, T., Brockmann, E.-C., Kuronen, O., Saraste, M., Lamminmäki, U. and Tuomola, M. (2004).** Engineering of a Broad Specificity Antibody for Simultaneous Detection of 13 Sulfonamides at the Maximum Residue Level. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 40-47

**Kortt, A.A., Clem Gruen, L. and Oddie, G.W. (1997).** Influence of Mass Transfer and Surface Ligand Heterogeneity on Quantitative BIAcore™ Binding Data. Analysis of the Interaction of NC10 Fab with an Anti-idiotypic Fab'. *Journal of Molecular Recognition*, 10, 148-158

**Krebber, A., Bornhauser, S., Burmester, J., Honegger, A., Willuda, J., Bosshard, H.R. and Plückthun, A. (1997).** Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *Journal of Immunological Methods*, 201, 35-55

**Lauer, B. (2005).** Rekombinante Antikörper gegen die Mykotoxine Fumonisin B1 und Ochratoxin A. Dissertation am Lehrgebiet Molekulargenetik, Universität Hannover

**Lauer, B., Ottleben, I., Jacobsen, H-J. and Reinard, T. (2005).** Production of single-chain variable fragment antibody against fumonisin B1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 899-904

**Li, B., Zhao, H., Liu, Q., Murali, R., Greene, M.I. and Zhang, H. (2002).** Deoxycholate-Based Method to Screen Phage Display Clones for Uninterrupted Open Reading Frames. *BioTechniques*, 33, 294-296

**Liedberg, B., Nylander, C. and Lundstrom, I. (1983).** Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators*, 4, 299-304



**Little, M., Welschhof, M., Braunagel, M., Hermes, I., Christ, C., Keller, A., Rohrbach, P., Kürschner, T., Schmidt, S., Kleist, C., Ternes, P. (1999).** Generation of a large complex antibody library from multiple donors. *Journal of Immunological Methods*, 231, 3-9

**Löfås, S. and Johnsson, B. (1990).** A Novel Hydrogel Matrix on Gold Surfaces in Surface Plasmon Resonance Sensors for Fast and Efficient Covalent Immobilization of Ligands. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 21, 1526-1528

**Long, A.R., Hsieh, L.C., Malbrough, M.S., Short, C.R., Barker, S.A. (1990).** Multiresidue method for the determination of sulfonamides in pork tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 423-426

**Low, N.M., Holliger, P. and Winter, G. (1996).** Mimicking Somatic Hypermutation: Affinity Maturation of Antibodies Displayed on Bacteriophage Using a Bacterial Mutator Strain. *Journal of Molecular Biology*, 260, 359-368

**Ma, J. K.-C. and Hein, M.B. (1995).** Plant Antibodies for Immunotherapy. *Plant Physiology*, 109, 341-346

**Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (2001).** Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag

**Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D. and Winter, G. (1991).** By-passing Immunization. Human Antibodies from V-gene Libraries Displayed on Phage. *Journal of Molecular Biology*, 222, 581-597

**McCafferty, J., Griffith, A.d., Winter, G. And Chiswell, D.J. (1990).** Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348, 552-554

**McConnell, S.J., Dinh, T., Le, M.-H. and Spinella, D.G. (1999).** Biopanning Phage Display Libraries Using Magnetic Beads Vs. Polystyrene Plates. *BioTechniques*, 26, 208-214

**Mercader, J.V. and Skerra, A. (2002).** Generation of anticalins with specificity for a nonsymmetric phthalic acid ester. *Analytical Biochemistry*, 308, 269-277

**Mitchell, J.S., Wu, Y., Cook, C.J. and Main, L. (2005).** Sensitivity enhancement of surface plasmon resonance biosensing of small molecules. *Analytical Biochemistry*, 343, 125-135

**Moghaddam, A., Løbersli, I., Gebhardt, K., Braunagel, M., Marvik, O.J. (2001).** Selection and characterisation of recombinant single-chain antibodies to the hapten Aflatoxin-B1 from naive recombinant antibody libraries. *Journal of Immunological Methods*, 254, 169-181

**Moghaddam, A., Borgen, T., Stacy, J., Kausmally, L., Simonsen, B., Marvik, O.J., Brekke, O.H., Braunagel, M. (2003).** Identification of scFv antibody fragments that specifically recognise the heroin metabolite 6-monoacetylmorphine but not morphine. *Journal of Immunological Methods*, 280, 139-155

**Mrksich, M. and Whitesides, G.M. (1996).** Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 25, 55-78

**Muldoon, M.T., Font, I.A., Beier, R.C., Holtzapple, C.K., Young, C.R. and Stanker, L.H. (1999).** Development of a Cross-Reactive Monoclonal Antibody to Sulfonamide Antibiotics: Evidence for Structural Conformation-Selective Hapten Recognition. *Food and Agricultural Immunology*, 11, 117-134

**Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Ehrlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplifications of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Symposium in Quantitative Biology*, 51, 263-273

**Nakata, Y., Tang, X. and Yokoyama, K.K. (1997).** Preparation of competent cells for high-efficiency plasmid transformation of *Escherichia coli*. *Methods in Molecular Biology*, 69, 129-137

**Nissim, A., Hoogenboom, H.R., Tomlinson, I.M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D. and Winter, G. (1994).** Antibody fragments form 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *The EMBO Journal*, 13 (3), 692-698

**Padlan, E.A. (1994).** Anatomy of the Antibody Molecule. *Molecular Immunology*, 31 (3), 169-217

**Pini, A., Viti, F., Santucci, A., Carnemolla, B.73, Zardi, L., Neri, P. and Neri, D. (1998).** Design and Use of a Phage Display Library. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (34), 21769-21776

**Plückthun, A. (1990).** Antibodies from *Escherichia coli*. *Nature*, 347, 497-498

**Plückthun, A., Krebber, A., Krebber, C., Horn, U., Knüpfer, U., Wenderoth, R., Nieba, L., Proba, K. and Riesenberger, D. (1996).** Producing antibodies in *Escherichia coli*: from PCR to fermentation. In *Antibody Engineering, A Practical Approach* (McCafferty, J., Hoogenboom, H.R. and Chiswell, D.J., eds.), pp.203-252, IRL Press, Oxford University Press, New York

**Plückthun, A. and Skerra, A. (1989).** Expression of Functional Antibody Fv and Fab Fragments in *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology*, 178, 497-515

**Pugsley, A.P. (1993).** The Complete General Secretory Pathway in Gram-Negative Bacteria. *Microbiological Reviews*, 57 (1), 50-108

**O'Brien, P.M. and Aitken, R. (2001).** Antibody phage display: Methods and protocols, Vol 178, Humana Press, Totowa, New Jersey

**Reinard, T., Sprunck, S., Altherr, S. and Jacobsen, H.-J. (1994).** Biochemical properties of a novel cell wall protein associated with elongation growth in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, 45, 1593-1601

**Rodi, D.J., Agoston, G.E., Manon, R., Lapcevich, R., Green, S.J. and Makowski, L. (2001).** Identification of Small Molecule Binding Sites within Proteins Using Phage Display Technology. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 4, 553-572

**Rondot, S., Koch, J., Breitling, F. and Dübel, S. (2001).** A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nature Biotechnology*, 19, 75-78

**Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> Edn., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York

**Sblattero, D. and Bradbury, A. (2000).** Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nature Biotechnology*, 18, 75-80

**Sche, P.P., McKenzie, M.M., White, J.D. and Austin, D.J. (1999).** Display cloning: functional identification of natural product receptors using cDNA-phage display. *Chemistry & Biology*, 6 (10), 707-716

**Sche, P.P., McKenzie, M.M., White, J.D. and Austin, D.J. (2001).** Corrigendum to: "Display cloning: functional identification of natural product receptors using cDNA-phage display". *Chemistry & Biology*, 8, 399-400

**Schier, R., Bye, J., Apell, G., McCall, A., Adams, G.P., Malmqvist, M., Weiner, L.M. and Marks, J.D. (1996).** Isolation of High-affinity Monomeric Human Anti-c-erbB-2 Single chain Fv Using Affinity-driven Selection. *Journal of Molecular Biology*, 255, 28-43

**Schillberg, S., Zimmermann, S., Voss, A. and Fischer, R. (1999).** Apoplastic and cytosolic expression of full-size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*. *Transgenic Research*, 8, 255-263

**Schouten, A., Roosien, J., van Engelen, F.A., de Jong, G.A.M., Borst-Vrenssen, A.W.M., Zilverentant, J.F., Bosch, D., Stiekema, W.J., Gommers, F.J., Schots, A. and Bakker, J. (1996).** The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology*, 30, 781-793

**Schouten, A., Roosien, J., de Boer, J.M., Wilmink, A., Rosso, M.-N., Bosch, D., Stiekema, W.J., Gommers, F.G., Bakker, J. and Schots, A. (1997).** Improving scFv antibody expression levels in the plant cytosol. *FEBS Letters*, 415, 235-241

**Seal, S.N., Monestier, M. and Radic, M.Z. (2000).** Diverse roles for the third complementarity determining region of the heavy chain (H3) in the binding of immunoglobulin Fv fragments to DNA, nucleosomes and cardiolipin. *European Journal of Immunology*, 30, 3432-3440

**Seehaus, T., Breitling, F., Dübel, S., Klewinghaus, I. and Little, M. (1992).** A vector for the removal of deletion mutants from antibody libraries. *Gene*, 114, 235-237

**Sheets, M.D., Amersdorfer, P., Finnern, R., Sargent, P., Lindqvist, E., Schier, R., Hemingsen, G., Wong, C., Gerhart, J.C. and Marks, J.D. (1998).** Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: The production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6157-6162

**Sheth, H.B. and Sporns, P. (1991).** Development of a Single ELISA for Detection of Sulfonamides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1696-1700

**Shirai, H., Kidera, A. and Nakamura, H. (1996).** Structural classification of CDR-H3 in antibodies. *FEBS Letters*, 399, 1-8

**Shirai, H., Kidera, A. and Nakamura, H. (1999).** H3-rules: identification of CDR-H3 structures in antibodies. *FEBS Letters*, 455, 188-197

**Smith, G.P. (1985).** Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on Virion Surface. *Science*, 228, 1315-1316

**Spinks, C.A., Wyatt, G.M., Lee, H.A. and Morgan, M.R.A. (1999).** Molecular Modeling of Hapten Structure and Relevance to Broad Specificity Immunoassay of Sulfonamide Antibiotics. *Bioconjugate Chemistry*, 10, 583-588

**Spinks, C.A., Wyatt, G.M., Everest, S., Jackman, R. And Morgan, M.R.A. (2002).** Atypical antibody specificity: advancing the development of a generic assay for sulphonamides using heterologous ELISA. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 428-434

**Steinbiß, H.-H. (1995).** Transgene Pflanzen. Spektrum Akademischer Verlag

**Stoger, E., Schilberg, S., Twyman, R.M., Fischer, R. and Christou, P. (2004).** Antibody production in Transgenic Plants. *Methods in Molecular Biology*, 248, 301-318

**Tang, X., Nakata, Y., Li, H.-Q., Zhang, M., Gao, H., Fujita, A., Sakatsume, O., Ohta, T. and Yokoyama, K. (1994).** The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E.coli*. *Nucleic Acids Research*, 22 (14), 2857-2858

**Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997).** The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25, 4876-4882

**Tomlinson, I.M., Walter, G., Marks, J.D., Llewelyn, M.B. and Winter, G. (1992).** The Repertoire of Human Germline V<sub>H</sub> Sequences Reveals about Fifty Groups of V<sub>H</sub> Segments with Different Hypervariable Loops. *Journal of Molecular Biology*, 227, 776-798

**Tuomola, M., Harpio, R., Mikola, H., Knuuttila, P., Lindström, M., Mikkala, V.-M., Matikainen, M.-T. and Lövgren, T. (2000).** Production and characterisation of monoclonal antibodies against a very small hapten, 3-methylindole. *Journal of Immunological Methods*, 240, 111-124

**Tur, M.K., Huhn, M., Sasse, S., Engert, A. and Barth, S. (2001).** Selection of scFv Phages on Intact Cells Under Low pH Conditions Leads to a Significant Loss of Insert-Free Phages. *BioTechniques*, 30, 404-413

**Vaughan, T.J., Williams, A.J., Pritchard, K., Osbourn, J.K., Pope, A.R., Earnshaw, J.C., McCafferty, J., Hodits, R.A., Wilton, J. and Johnson, K.S. (1996).** Human Antibodies with Sub-nanomolar Affinities Isolated from a Large Non-immunized Phage Display Library. *Nature Biotechnology*, 14, 309-314

**Viti, F., Nilsson, F., Demartis, S., Huber, A. and Neri, D. (2000).** Design and Use of Phage Display Libraries for the Selection of Antibodies and Enzymes. *Methods in Enzymology*, 326, 480-505

**Voss, A., Niersbach, M., Hain, R., Hirsch, H. J., Liao, Y. C., Kreuzaler, F. and Fischer, R. (1995).** Reduced virus infectivity in *N. tabacum* secreting a TMV-specific full-size antibody. *Molecular Breeding*, 1, 39-50

**Wälchli, S., Espanel, X., Harrenga, A., Rossi, M., Cesareni, G. and van Huijsduijnen, R.H. (2004).** Probing Protein-tyrosine Phosphatase Substrate Specificity Using a Phosphotyrosine-containing Phage Library. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (1), 311-318

**Wandelt, C.I., Khan, M.R.I., Craig, S., Schroeder, H.E., Spencer, D. and Higgins, T.J.V. (1992).** Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. *The Plant Journal*, 2 (2), 181-192

**Whitelegg, N.R.J. and Rees, A.R. (2000).** WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB. *Protein Engineering*, 13 (12), 819-824

**Whitelegg, N.R.J. and Rees, A.R. (2004).** Antibody variable regions: toward a unified modelling method. *Methods in Molecular Biology*, 248, 51-91

**Willats, W.G.T. (2002).** Phage display: practicalities and prospects. *Plant Molecular Biology*, 50, 837-854

**Williams, S.C. and Winter, G. (1993).** Cloning and sequencing of human immunoglobulin V gene segments. *European Journal of Immunology*, 23, 1456-1461

**Winter, G. and Milstein, C. (1991).** Man-made antibodies. *Nature*, 349, 293-299

**Wörn, A. and Plückthun, A. (2001).** Stability Engineering of Antibody-Single-chain Fv Fragments. *Journal of Molecular Biology*, 305, 989-1010

**Yau, K.Y.F., Lee, H. and Hall J.C. (2003).** Emerging trends in synthesis and improvement of hapten-specific recombinant antibodies. *Biotechnology Advances*, 21, 599-637

**Yuan, Q., Clarke, J.R., Zhou, H.-R., Linz, J.E., Pestka, J.J. and Hart, L.P. (1997).** Molecular Cloning, Expression and Characterization of a Functional Single-Chain Fv Antibody to the Mycotoxin Zearalenone. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (1), 263-269



**Yuan, Q., Hu, W., Pestka, J.J., He, Y.S. and Hart, L.P. (2000).** Expression of a Functional Antizearalenone Single-Chain Fv Antibody in Transgenic Arabidopsis Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (8), 3499-3505

**Ziemienowitz, A. (2001).** Odyssey of *Agrobacterium* T-DNA. *Acta Biochimica Polonica*, 48 (1), 623-631

**Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O. and Zambryski, P. (2000).** The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal*, 23 (1), 11-28

## Danksagung

Zu allererst möchte ich Herrn Prof. Dr. H.-J. Jacobsen für die Möglichkeiten zur Durchführung dieser Arbeit, die guten Arbeitsbedingungen und die freundliche Arbeitsatmosphäre danken.

Herrn HD. Dr. B. Huchzermeyer danke ich für die Übernahme des Korreferats

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Reinard für die Betreuung dieser Arbeit, seine unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie dafür, dass ihm die Ideen niemals ausgingen.

Dr. Holger Ottleben und Dr. Kristina Schmidt von der Firma Graffinity Pharmaceutical Design Heidelberg danke ich für die Überlassung des SMP-Thiol Konjugats.

Allen Mitgliedern des Instituts für Pflanzengenetik danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und ihre Unterstützung. Sandra Schmackeit danke ich speziell für die gewissenhafte Pflege meiner Tabakpflanzen. Ein besonderer Dank geht auch an André Frenzel für seine stete Hilfsbereitschaft.

Den Mitgliedern der AG Biochemie Noel Ferro Diaz, Björn Lauer, Maren Wichmann, Livia Saleh, Katharina Klee und Anke Schröder danke ich für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft sowie den ausgesprochen freundlichen Umgang.

Noel Ferro Diaz danke ich für sein großes Interesse an meiner Arbeit, seine anregenden Ideen und seine große Hilfsbereitschaft bei Fragen zur theoretischen Chemie.

Jasmin Doll danke ich besonders für ihre Freundschaft und die angenehme Zeit, die wir innerhalb und außerhalb des Labors verbracht haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Thomas Klug dafür, dass er mir in allen erdenklichen Situationen den Rücken stärkt.

Der größte Dank geht an meine Eltern Hermann und Regine Ottleben und an meine beiden Brüder Holger und Martin. Durch ihre bedingungslose Unterstützung, ihr Interesse und ihre Anteilnahme an meiner Arbeit und die Kraft, die sie mir geben, ist diese Arbeit überhaupt möglich geworden.

## **Lebenslauf**

### **Lebensdaten**

Name	Ilka Ottleben
Geburtsdatum	30.07.1976
Geburtsort	Hannover

### **Schul Ausbildung**

1982 bis 1986	Grundschule Seelze
1986 bis 1988	Orientierungsstufe Seelze
1988 bis 1995	Georg-Büchner-Gymnasium Letter
	Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife

### **Hochschulbildung**

1995 bis 1996	Studium der Landschafts- und Freiraumplanung an der Universität Hannover
1996 bis 2002	Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Hannover
03/2002	Diplomprüfung, Anfertigung einer Diplomarbeit am Lehrgebiet Molekulargenetik, Abschluss als Diplom-Biologin
Seit 04/2002	Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Lehrgebiet Molekulargenetik, Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. H.-J. Jacobsen